



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Bioprospección de la especie *Ocotea caudata* Nees (Lauraceae)

Elizabeth Gil Archila

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016

Bioprospección de la especie *Ocotea caudata* Nees (Lauraceae)

Elizabeth Gil Archila

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias – Química

Director:

Dr. Luis Enrique Cuca Suárez

Profesor titular Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Productos Naturales Vegetales

Grupo de Investigación:

Estudio químico y de actividad biológica de Rutaceae y Myristicaceae Colombianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2016

*A Dios todopoderoso, a mis padres,
hermanos, sobrinos y Mauricio, son el tesoro
más valioso de mi vida.*

Agradecimientos

A Dios por su infinito amor, gracia y bondad para conmigo. Su presencia siempre ha estado conmigo.

A mis padres, Gabriel y Mauricio por su apoyo incondicional, por su amor y tantas alegrías.

Al profesor LUIS ENRIQUE CUCA SUÁREZ, por la confianza al haberme aceptado en su grupo de investigación, por su valiosa colaboración, dirección y orientación.

A la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo en este mi proyecto de vida. A los profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana, en especial del Departamento de Química y sus auxiliares. A las Doctoras Ingrid Schuller y Concepción Puerta, así como Henry Córdoba y Crispín Celis por creer en mí y facilitar este proceso.

Quiero expresar mi agradecimiento especial a Alix Loaiza y John Edwar Díaz por su constante ayuda en mi tesis, a Nohemí Téllez, Jorge Robles, Juliet Prieto, Ricardo Vera, Alejandro Reyes, Matilde Lucio, Geison Costa, Sol Mejía, Jorge Narváez, Jaime González, Patricia Puentes y Milton Hernández por su colaboración y sus palabras muy oportunas.

Al profesor Massuo Kato, Lydía, Yasmín, Tara, Gerardo, Celso, Harold, Anderson, Marcilio y Mauro, integrantes del Laboratório de Química de Produtos Naturais del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo (USP), Brasil, por su ayuda y soporte científico durante mi estadía de investigación en la USP, así como a Felipe por sus consejos y amistad durante este tiempo en el Brasil.

Agradezco a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Productos Naturales vegetales de la Universidad Nacional de Colombia y del Grupo de Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia: Andrea, Cata, Víctor, Jorge, Juan Manuel, Diana, Juliet, Lorena, Tatiana R, Diego, Juan Carlos, William, Willy, Érica, Tatiana A y Sandra Molina y a los profesores Wilman, Mónica y Oscar por todas las cosas buenas que aprendí de cada uno de Ustedes.

Al Profesor Ericsson Coy del Laboratorio de Química Bioorgánica y su equipo de trabajo: Lorena, Willy y Camilo por su amabilidad y siempre dispuestos a colaborar y enseñar lo que hacen.

A la División de Investigación Sede Bogotá – DIB, por la ayuda en la financiación de esta investigación mediante la convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015.

A luz Helena Núñez de Laboratorios Phitother.

A los profesores del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por sus enseñanzas, ejemplo y colaboración durante mi doctorado, en especial a los profesores: Luis Enrique Cuca, Cesar Sierra, Leonardo Castellanos, Coralia Osorio, Freddy Ramos, Jaime Ríos y Jesús Daza, a quienes les asistí a sus clases y tuvieron la amabilidad de compartir sus conocimientos... Muchas gracias.

A Camila, Tatiana Robayo y Gina, por su apoyo durante la realización de los ensayos antibacterianos y ácidos grasos.

Resumen

El estudio fitoquímico de las hojas de *Ocotea caudata* (Lauraceae) condujo al aislamiento de veintiséis compuestos: β -sitosterol (**Oc-5**), 1-triacontanol (**Oc-6**), *p*-hidroxifenilacetato de etilo (**Oc-7**), éster metílico del ácido cóstico (**Oc-8**), ácido cóstico (**Oc-9**), 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona (**Oc-10**), ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**), quercetina (**Oc-12**), afzelina (**Oc-13**), astragalina (**Oc-14**), isoquercitrina (**Oc-15**), thalictuberina (**Oc-16**), 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**), (+)-3-hidroxi*nomuciferina* (**Oc-18**), (+)-3-metoxi*nordomesticina* (**Oc-19**), (+)-*nordomesticina* (**Oc-20**), S-(+)-9-O-demetil*norpreocoteina* (**Oc-21**), (+)-*isoboldina* (**Oc-22**), (+)-*boldina* (**Oc-23**), (+)-*reticulina* (**Oc-24**), (+)-*palidina* (**Oc-25**), (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**), una mezcla de ácido palmítico (**Oc-1**) y ácido linoleico (**Oc-2**) y una mezcla de esteroides: campesterol (**Oc-3**), estigmasterol (**Oc-4**) y β -sitosterol (**Oc-5**). El alcaloide **Oc-21** no presenta reportes previos en la literatura, constituyéndose en una sustancia nueva, en cuanto a **Oc-10**, **Oc-18** y **Oc-26** se describen por primera vez para el género y la familia. Las determinaciones estructurales se realizaron con base en los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C uni- y bidimensionales, datos de espectrometría de masas y valores de rotación óptica.

Esta investigación se amplió a otras partes de la planta mediante un estudio de derreplicación y análisis multivariado por HPLC-DAD-MSESI, tomando como referencia los metabolitos aislados de las hojas, lo que permitió detectar varias de las sustancias aisladas en las otras partes de la planta, encontrándose una estrecha relación entre la composición química de las hojas con la composición química de las flores, los frutos y cáliz; mientras que para la corteza y madera esta relación no fue tan cercana.

El perfil de los metabolitos secundarios incluyó el análisis del aceite esencial (AE) de las hojas y la fracción lipídica de los frutos y cáliz, indicando para el AE el predominio de sesquiterpenos (83.7 %) sobre los monoterpenos (1.6 %) y ausencia de fenilpropanóides. En la fracción lipídica de los frutos y cáliz se encontró en mayor abundancia ácidos grasos saturados que insaturados. De acuerdo con esto, se propuso elaborar una emulsión en la que se incorporó esta fracción de ácidos grasos buscando encontrar una aplicación a la especie diferente del uso tradicional que se le da en la región donde se ubica la planta objeto de estudio. Los resultados preliminares de estabilidad indican que la fracción lipídica ofrece una opción para la elaboración de emulsiones con posibles usos vía tópica.

Teniendo en cuenta la variedad de actividades biológicas atribuidas a metabolitos aislados de especies del género *Ocotea*, entre ellas actividades antimicrobianas, se evaluó la actividad antibacteriana a los compuestos aislados frente a cuatro cepas; dos Gram positivas y dos Gram negativas. Los resultados obtenidos muestran que los metabolitos de tipo fenólico, ácido graso y esteroles presentaron inhibición de todas las bacterias ensayadas; mientras que la mayoría de los alcaloides mostraron acción únicamente frente a las bacterias Gram positivas, excepto la thalictuberina (**Oc-16**), 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**), 3-metoxinordomesticina (**Oc-19**) y *nordomesticina* (**Oc-20**) que además exhibieron efecto antibacteriano contra *E. coli* a 2 mg/mL.

Finalmente, de acuerdo con los resultados de actividad antibacteriana obtenidos con los dos alcaloides fenantrénicos aislados (**Oc-16** y **Oc-17**) frente a *E. coli*, a la poca cantidad aislada de cada uno de los metabolitos y a la nula actividad de la boldina (**Oc-23**), se propuso realizar modificaciones estructurales a **Oc-23** con el fin de evaluar cambios en la actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados comparado con **Oc-23**. Los compuestos sintetizados son alcaloides de tipo fenantrénico: *N*-propargilsecoboldina (**S-1**), *N*-cinamilsecoboldina (**S-2**), *N*-prenil-7-O-preniloxisecoboldina (**S-3**) y *N*-prenilsecoboldina (**S-4**) presentaron efecto inhibitorio frente a las dos bacterias Gram positivas.

Palabras clave: Lauraceae, *Ocotea caudata*, alcaloides aporfínicos, alcaloides fenantrénicos, actividad antibacteriana.

Abstract

The phytochemical study of leaves of *Ocotea caudata* (Lauraceae) led to the isolation of twenty-six compounds: β -sitosterol (**Oc-5**), 1-triacontanol (**Oc-6**), ethyl *p*-hydroxyphenylacetate (**Oc-7**), costic acid methyl ester (**Oc-8**), costic acid (**Oc-9**), 7,4'-dimethoxy-3-hydroxyflavone (**Oc-10**), *p*-hydroxyphenylacetic acid (**Oc-11**), quercetin (**Oc-12**), afzeline (**Oc-13**), astragaline (**Oc-14**), isoquercitrine (**Oc-15**), thalictuberine (**Oc-16**), 3-O-demethylthalictuberine (**Oc-17**), (+)-3-hydroxynornuciferine (**Oc-18**), (+)-3-methoxynordomesticine (**Oc-19**), (+)-nordomesticine (**Oc-20**), *S*-(+)-9-O-demethylnorpreocoteine (**Oc-21**), (+)-isoboldine (**Oc-22**), (+)-boldine (**Oc-23**), (+)-reticuline (**Oc-24**), (+)-pallidine (**Oc-25**), (-)-*trans*-4-hydroxy-*N*-methylproline (**Oc-26**), a mixture of palmitic acid (**Oc-1**) and linoleic acid (**Oc-2**) and a mixture of sterols: campesterol (**Oc-3**), stigmasterol (**Oc-4**) y β -sitosterol (**Oc-5**). The alkaloid **Oc-21** does not present previous reports in the literature, indicating that it is a new structure, as to **Oc-10**, **Oc-18** and **Oc-26** are described for the first time for the genus and the family. The structural determinations were performed by ^1H and ^{13}C NMR spectral data analysis (1D and 2D), mass spectrometry data and optical rotation values.

This research was extended to other parts of the plant by means of multivariate analysis and dereplication of the isolated metabolites of the leaves, by HPLC-DAD-ESIMS, allowing the detection of several of the isolated substances in the other parts plant, finding a close relation between the chemical composition of the leaves with the chemical composition of the flowers, fruits and calyces; while for bark and wood this relationship was not so close.

The profile of the secondary metabolites included the analysis of the essential oil (EO) of the leaves and the lipid fraction of fruits and calyx, indicating for EO the predominance of sesquiterpenes (83.7%) over monoterpenes (1.6%) and absence of

phenylpropanoids. In the lipid fraction of the fruits and calyx was found to be more abundant saturated fatty acids than unsaturated fatty acids. Accordingly, it was proposed to elaborate an emulsion that incorporates this fraction of fatty acids in order to find an application to the specie other than the use traditional that occurs in the region where this plant is located. The preliminary stability results indicate that the lipid fraction offers an option for obtaining emulsions with possible topical uses.

Taking into account the variety of biological activities attributed to the metabolites isolated from species of the genus *Ocotea*, including antimicrobial activities, the antibacterial activity and the isolated compounds were evaluated against four strains: two Gram positive and two Gram negative. The results obtained with the metabolites of phenolic type, fatty acid and sterol present inhibition of all the tested bacteria; while the most of the alkaloids shown activity against Gram positive bacterias, highlighting the thalictuberine (**Oc-16**), 3-O-demethylthalictuberine (**Oc-17**), 3-methoxynordomesticine (**Oc-19**) and nordomesticine (**Oc-20**) that also exhibited action against *E. coli* at 2 mg/mL.

Finally, according to the results of antibacterial activity obtained with the two phenanthrenic alkaloids (**Oc-16** and **Oc-17**) against *E. coli*, the small amount isolated from each of the metabolites and the null activity of boldine (**Oc-23**), it was proposed to make structural modifications to **Oc-23** in order to evaluate improvements in the antibacterial activity of the synthesized compound compared to **Oc-23**. The compounds synthesized are phenanthrene alkaloids: *N*-propargilsecoboldine (**S-1**), *N*-cinnamylsecoboldine (**S-2**), *N*-prenyl-7-O-prenylsecoboldine (**S-3**) and *N*-prenylsecoboldine (**S-4**), which shown activity against the two Gram-positive bacterias.

Key words: Lauraceae, *Ocotea caudata*, aporphine alkaloids, phenanthrene alkaloids, antibacterial activity

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VIII
Abstract	X
Contenido	XII
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVIII
Introducción	1
1. Estado actual del tema	5
1.1 Generalidades del género <i>Ocotea</i>	5
1.1.1 <i>Taxonomía y distribución del género Ocotea.</i>	6
1.1.2 <i>Etnobotánica del género Ocotea</i>	7
1.1.3 <i>Generalidades de la especie Ocotea caudata</i>	8
1.1.4 <i>Metabolitos secundarios presentes en algunas especies del género Ocotea y su actividad biológica.</i>	9
1.1.5 <i>Panorama de la modificación de los productos naturales para mejorar sus propiedades biológicas.</i>	19
2. Metodología.....	22
2.1 Instrumentos	22
2.2 Materiales.....	23
2.2.1 <i>Disolventes y reactivos</i>	23
2.2.2 <i>Columnas y placas cromatográficas</i>	23
2.2.3 <i>Material vegetal</i>	24
2.3 Estudio fitoquímico de <i>O. caudata</i>	24
2.3.1 <i>Obtención de los extractos de los órganos de O. caudata.</i>	24
2.3.2 <i>Fraccionamiento del extracto de hojas de O. caudata con disolventes de diferente polaridad.</i>	25
2.3.3 <i>Obtención del extracto alcaloidal de las hojas de O. caudata.</i>	27
2.3.4 <i>Estudio comparativo entre los diferentes órganos de O. caudata con base en la composición química.</i>	28
2.3.5 <i>Extracción de los aceites esenciales de las hojas de O. caudata.</i>	31

2.3.6	<i>Estudio de la fracción lipídica de los frutos de O. caudata.</i>	32
2.3.7	<i>Síntesis de alcaloides fenantrénicos a partir de boldina (Oc-23)</i>	38
2.3.8	<i>Actividad antibacteriana del aceite esencial y los compuestos aislados de las hojas de O. caudata y de los compuestos sintetizados.</i>	43
3.	Resultados y Discusión	45
3.1	Estudio fitoquímico de las hojas de <i>O. caudata</i>	45
3.1.1	<i>Elucidación estructural de alcaloides isoquinolínicos.</i>	48
3.1.2	<i>Datos espectroscópicos de los alcaloides conocidos aislados de hojas de O. caudata.</i>	58
3.1.3	<i>Datos espectroscópicos de los flavonoides y fenoles conocidos aislados de hojas de O. caudata.</i>	73
3.1.4	<i>Datos espectroscópicos de los hidrocarburos y terpenos conocidos aislados de hojas de O. caudata.</i>	85
3.2	Estudio comparativo entre los diferentes órganos de <i>O. caudata</i> con base en la composición química.	92
3.2.1	<i>Derreplicación de los compuestos aislados de las hojas en los extractos de corteza, madera, frutos, cáliz y flores.</i>	93
3.2.2	<i>Comparación de los extractos de los órganos de O. caudata por análisis multivariado.</i>	96
3.3	Composición química de los aceites esenciales	98
3.4	Composición química de la fracción lipídica de los frutos de <i>O. caudata</i>	102
3.4.1	<i>Uso de la fracción lipídica en la elaboración de una emulsión.</i>	105
3.5	Modificaciones químicas de la boldina	108
3.5.1	<i>Discusión sobre la elucidación de los compuestos S-1, S-2, S-3 y S-4</i>	109
3.6	Actividad antibacteriana del aceite esencial, los compuestos aislados y sintetizados.	123
3.6.1	<i>Actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de O. caudata.</i>	123
3.6.2	<i>Actividad antibacteriana de los metabolitos aislados de hojas de O. caudata.</i>	124
3.6.3	<i>Actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados a partir de boldina.</i>	128
4.	Conclusiones y perspectivas.	130
	Bibliografía.	134

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Fotografía de la especie <i>Ocotea caudata</i>	6
Figura 1-2. Distribución de la especie <i>Ocotea caudata</i> en América. [19].....	7
Figura 2-1. Diagrama de la extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de <i>O. caudata</i>	26
Figura 2-2. Diagrama de la extracción, fraccionamiento y purificación de los alcaloides presentes en las hojas de <i>O. caudata</i>	28
Figura 2-3. Participación de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos desde 1981 a 2010 [80].	38
Figura 2-4. Síntesis de los derivados de la boldina.....	42
Figura 3-1. Metabolitos aislados de las hojas de <i>Ocotea caudata</i> agrupados por a. terpenos, esteroides, ácidos y alcohol grasos; b. fenoles y flavonoides y c. alcaloides ...	46
Figura 3-2. Núcleo básico de los alcaloides aporfínicos	48
Figura 3-3. Espectro de dicroísmo circular de Oc-21	51
Figura 3-4. Perfil cromatográfico a 280 nm y espectro de masas de Oc-21	51
Figura 3-5. Fragmentaciones observadas para el compuesto Oc-21 [108].	52
Figura 3-6. Espectro RMN ¹ H de Oc-21 (300 MHz, CDCl ₃).....	54
Figura 3-7. Espectro de RMN ¹³ C APT de Oc-21 (75 MHz, CDCl ₃).....	54
Figura 3-8. Espectro HSQC de Oc-21 (300/75 MHz, CDCl ₃).	55
Figura 3-9. Espectro COSY ¹ H - ¹ H de Oc-21 (300 MHz, CDCl ₃).....	56
Figura 3-10. Espectro HMBC de Oc-21 (300/75 MHz, CDCl ₃).	57
Figura 3-11. Espectro NOESY de Oc-21 (300 MHz, CDCl ₃).	57
Figura 3-12. Estructura de Oc-21	58
Figura 3-13. Espectro RMN ¹ H de (+)-3-hidroxi-nomuciferina (Oc-18)	59
Figura 3-14. Espectro RMN ¹³ C de (+)-3-hidroxi-nomuciferina (Oc-18)	60
Figura 3-15. Espectro RMN ¹ H de (+)-isoboldina (Oc-22) (300 MHz, CDCl ₃).	60
Figura 3-16. Espectro RMN ¹³ C de (+)-isoboldina (Oc-22) (75 MHz, CDCl ₃).	61
Figura 3-17. Espectro RMN ¹ H de Thalictuberina (Oc-16) (300 MHz, CDCl ₃).	62
Figura 3-18. Espectro RMN ¹³ C de Thalictuberina (Oc-16) (75 MHz, CDCl ₃).	62
Figura 3-19. Espectro RMN ¹ H de 3-O-demetilthalictuberina (Oc-17)	63
Figura 3-20. Espectro RMN ¹³ C de 3-O-demetilthalictuberina (Oc-17)	64
Figura 3-21. Espectro RMN ¹ H de (+)-nordomesticina (Oc-20) (300 MHz, CDCl ₃).....	65

Figura 3-22. Espectro RMN ^{13}C de (+)-nordomesticina (Oc-20) (75 MHz, CDCl_3)	65
Figura 3-23. Espectro RMN ^1H de (+)-reticulina (Oc-24) (300 MHz, CDCl_3).....	66
Figura 3-24. Espectro RMN ^{13}C de (+)-reticulina (Oc-24) (75 MHz, CDCl_3).	67
Figura 3-25. Espectro RMN ^1H de (+)-3-metoxinordomesticina (Oc-19)	68
Figura 3-26. Espectro RMN ^{13}C de (+)-3-metoxinordomesticina (Oc-19)	68
Figura 3-27. Espectro RMN ^1H de (+)-boldina (Oc-23) (300 MHz, CDCl_3).....	69
Figura 3-28. Espectro RMN ^{13}C de (+)-boldina (Oc-23) (75 MHz, CDCl_3).....	70
Figura 3-29. Espectro RMN ^1H de (+)-palidina (Oc-25) (300 MHz, CDCl_3).....	71
Figura 3-30. Espectro RMN ^{13}C de (+)-palidina (Oc-25) (75 MHz, CDCl_3).....	71
Figura 3-31. Espectro RMN ^1H de (-)-trans-4-hidroxi-N-metilprolina (Oc-26)	72
Figura 3-32. Espectro RMN ^{13}C de (-)-trans-4-hidroxi-N-metilprolina (Oc-26)	73
Figura 3-33. Espectro RMN ^1H de Afzelina (Oc-13) (300 MHz, CD_3OD).....	74
Figura 3-34. Espectro RMN ^{13}C de Afzelina (Oc-13) (75 MHz, CD_3OD).	74
Figura 3-35. Espectro RMN ^1H de Quercetina (Oc-12) (300 MHz, CD_3OD).	75
Figura 3-36. Espectro RMN ^{13}C de la Quercetina (Oc-12) (75 MHz, CD_3OD).	76
Figura 3-37. Perfil cromatográfico a 280 nm de la mezcla Oc-14 y Oc-15 y espectro de masas de Oc-14 y Oc-15	76
Figura 3-38. Espectro RMN ^1H de la Astragalina (Oc-14) en la mezcla	77
Figura 3-39. Espectro RMN ^{13}C de la Astragalina (Oc-14) en la mezcla	78
Figura 3-40. Espectro RMN ^1H de la Isoquercitrina (Oc-15) en la mezcla	79
Figura 3-41. Espectro RMN ^{13}C de la Isoquercitrina (Oc-15) en la mezcla.....	79
Figura 3-42. Espectro RMN ^1H de 7,4'-Dimetoxi-3'-hidroxiflavona (Oc-10)	80
Figura 3-43. Espectro RMN ^{13}C de 7,4'-Dimetoxi-3'-hidroxiflavona (Oc-10)	81
Figura 3-44. Perfil cromatográfico a 280 nm y espectro de masas de Oc-10 . A. Cromatograma HPLC a 280 nm. B. Espectro de masas HRMS-ESI modo positivo.....	81
Figura 3-45. Espectro RMN ^1H de Ácido p-hidroxifenilacético (Oc-11)	82
Figura 3-46. Espectro RMN ^{13}C de Ácido p-hidroxifenilacético (Oc-11)	83
Figura 3-47. Espectro RMN ^1H de p-hidroxifenilacetato de etilo (Oc-7)	84
Figura 3-48. Espectro RMN ^{13}C de p-hidroxifenilacetato de etilo (Oc-7)	84
Figura 3-49. Espectro RMN ^1H de 1-Triacontanol (Oc-6) (300 MHz, CDCl_3).	85
Figura 3-50. Espectro RMN ^{13}C de 1-Triacontanol (Oc-6) (75 MHz, CDCl_3).	86
Figura 3-51. Espectro RMN ^1H de Ácido cóstico (Oc-9) (300 MHz, CDCl_3).....	87
Figura 3-52. Espectro RMN ^{13}C de Ácido cóstico (Oc-9) (75 MHz, CDCl_3).....	87
Figura 3-53. Espectro RMN ^1H de Éster metílico del ácido cóstico (Oc-8)	88
Figura 3-54. Espectro RMN ^{13}C de Éster metílico del ácido cóstico (Oc-8)	89
Figura 3-55. Espectro RMN ^1H de β-Sitosterol (Oc-5) (300 MHz, CDCl_3).	90
Figura 3-56. TIC y espectro de masas del β-Sitosterol (Oc-5)	90
Figura 3-57. TIC y espectros de masas de la mezcla de Oc-1 y Oc-2	91
Figura 3-58. TIC y espectros de masas de la mezcla de Oc-3 , Oc-4 y Oc-5	92
Figura 3-59. Perfiles cromatográficos de los metabolitos aislados y de los extractos hojas, corteza, madera, flores, frutos y cáliz a 270nm.	93

Figura 3-60. Perfiles cromatográficos de los metabolitos aislados y de los extractos de hojas (OcHEtOH) a 270nm	94
Figura 3-61. Perfiles cromatográficos de los extractos de A) corteza (OcCEtOH) y B) madera (OcMEtOH) a 270nm	95
Figura 3-62. Perfiles cromatográficos de los extractos de A. Flores (OcFIEtOH), B. Frutos (OcFrEtOH), C. Cáliz (OcCálizEtOH) y D. Hojas (OcHEtOH) a 270nm.	95
Figura 3-63. Diagrama de <i>scores</i> del PCA 3D para los extractos de hojas, flores, cáliz, frutos, corteza y madera.	97
Figura 3-64. Dendograma para los extractos de corteza, madera, frutos, cáliz, flores y hojas.	98
Figura 3-65. TIC del aceite esencial de hojas de <i>O. caudata</i>	100
Figura 3-66. Cromatograma de los ácidos grasos de los frutos por GC-FID.....	103
Figura 3-67. Esquema de un alcaloide fenantrénico.....	110
Figura 3-68. Espectro RMN ¹ H de S-1 (300 MHz, CDCl ₃).	112
Figura 3-69. Espectro de RMN ¹³ C APT de S-1 (75 MHz, CDCl ₃)	112
Figura 3-70. Espectro HSQC de S-1 (300/75 MHz, CDCl ₃).....	113
Figura 3-71. Espectro HMBC de S-1 (300/75 MHz, CDCl ₃).....	113
Figura 3-72. Espectro NOESY de S-1 (300 MHz, CDCl ₃).	114
Figura 3-73. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de S-1	114
Figura 3-74. Fragmentaciones observadas para el compuesto S-1	115
Figura 3-75. Espectro RMN ¹ H de S-2 (300 MHz, CDCl ₃).	116
Figura 3-76. Espectro RMN ¹³ C de S-2 (75 MHz, CDCl ₃).	116
Figura 3-77. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de S-2	117
Figura 3-78. Fragmentaciones observadas para el compuesto S-2	117
Figura 3-79. Espectro RMN ¹ H de S-3 (300 MHz, CDCl ₃).	118
Figura 3-80. Espectro RMN ¹³ C APT de S-3 (75 MHz, CDCl ₃).	119
Figura 3-81. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de S-3	119
Figura 3-82. Fragmentaciones observadas para el compuesto S-3	120
Figura 3-83. Espectro RMN ¹ H de S-4 (300 MHz, CD ₃ OD).	121
Figura 3-84. Espectro RMN ¹³ C APT de S-4 (75 MHz, CD ₃ OD).	121
Figura 3-85. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de S-4	122
Figura 3-86. Fragmentaciones observadas para el compuesto S-4	122
Figura 3-87. Halos de inhibición de la (+)-3-metoxinordomesticina, evaluada a: 13 2 mg/mL; 14 1 mg/mL y 15 0,5 mg/mL frente a: a. <i>B. subtilis</i> , b <i>S. aureus</i> , c. <i>E. coli</i> y d. <i>P. aeruginosa</i> . B: DMSO y V: vancomicina.	129

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Especies del género <i>Ocotea</i> utilizadas en la medicina tradicional.	7
Tabla 2-1. Datos obtenidos de las curvas de calibración para la cuantificación de ácidos grasos por GC-FID.....	34
Tabla 3-1. Datos de RMN ¹ H y ¹³ C (300/75 MHz, CDCl ₃) de Oc-21	53
Tabla 3-2. Correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC de Oc-21	56
Tabla 3-3. Principales componentes del aceite esencial de hojas de <i>O. caudata</i>	99
Tabla 3-4. Composición de los ácidos grasos de frutos y cáliz de <i>O. caudata</i>	102
Tabla 3-5. Exposición de la emulsión a 20 y 37 °C durante uno y dos meses.	107
Tabla 3-6. Condiciones de reacción para la obtención de la <i>N</i> -propargilsecoboldina (S-1).....	109
Tabla 3-7. Diámetro de la zona de inhibición (mm) del aceite esencial de <i>O. caudata</i> .123	
Tabla 3-8. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de la mezcla de ácidos grasos (Oc-1 y Oc-2), la mezcla de esteroides (Oc-3 , Oc-4 y Oc-5), el alcohol graso (Oc-6) y los sesquiterpenos (Oc-8 y Oc-9).....	124
Tabla 3-9. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de los compuestos fenólicos (Oc-7 , Oc-10 – Oc-15) aislados de hojas de <i>O. caudata</i>	125
Tabla 3-10. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de los alcaloides (Oc-6 – Oc-26) aislados de hojas de <i>O. caudata</i>	126
Tabla 3-11. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de los compuestos sintetizados (S-1 – S-4).....	128

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
AcOEt	Acetato de etilo
AcOiPr	Acetato de <i>isopropilo</i>
AE	Aceite esencial
APT	<i>Attached Proton Test</i>
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CF	Cromatografía <i>flash</i>
CLV	Cromatografía líquida al vacío
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Doblete
da	Doblete ancho
dd	Doble doblete
DCM	Diclorometano
DE	Desviación estándar
dt	Doble triplete
EdP	Éter de petróleo
ESI	Ionización por <i>electrospray</i>
EtOH	Etanol
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización por llama
HCA	<i>Hierarchical Conglomerate Analysis</i> (Análisis de conglomerados jerárquicos)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC-DAD-MSESI	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos espectrometría de masas con interfase <i>electrospray</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HRMS-ESI	Espectrometría de masas de alta resolución-interfase <i>electrospray</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IE	Ionización electrónica
IR	Índice de retención de Kovats
m	Multiplete
MeOH	Metanol

Abreviatura	Término
MHz	Megahertz
MS	Espectrometría de masas
MS-ESI	Espectrometría de masas interfase <i>electrospray</i>
NIPALS	<i>Non-linear Partial Least Squares</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de componentes principales)
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
s	Singlete
sa	Singlete ancho
t	Triplete
t _R	Tiempo de retención
TIC	Corriente iónica total
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
[α]	Rotación óptica
δ _C	Desplazamiento químico en ¹³ C
δ _H	Desplazamiento químico en ¹ H

Introducción

Los metabolitos secundarios están presentes en todas las plantas superiores, generalmente con una alta diversidad estructural [1]. Inicialmente se les definió como opuestos al metabolismo primario, y su nombre se atribuyó por su baja abundancia en relación con las moléculas principales (representan menos del 1% del carbono total de la planta, acumulándose en células u órganos específicos). No obstante, gracias a los adelantos en las técnicas instrumentales, la bioquímica y la biología, se ha demostrado que desempeñan un papel fundamental en la adaptación de los vegetales al ambiente [1,2]. Por ejemplo, cuando las plantas son atacadas por depredadores herbívoros o microorganismos patógenos, ellas por su condición de organismos sésiles no pueden huir por lo que recurren a algunos metabolitos secundarios como defensa. Además de esta función algunas plantas emplean estos metabolitos para atraer animales que ayuden a la polinización y dispersión de sus semillas. Por lo tanto, la distribución de un tipo de metabolito puede ser una base para la quimiotaxonomía de una especie y la ecología química [1,2].

Estos metabolitos ofrecen ventajas no sólo a la planta sino al hombre, su uso en la medicina tradicional es conocido desde las primeras civilizaciones de la humanidad, así como las comprobadas actividades biológicas valoradas hoy en día por la industria farmacéutica, cosmética, nutracéutica y como materiales de partida para la química fina, entre otras [2]. La investigación centrada en estos productos naturales (PNs) precisamente ha dado lugar a los procesos de bioprospección, definidos, según Duarte y Velho [3], como “la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que posean un valor económico actual o potencial y que se encuentran en los componentes de la diversidad biológica” [3]. Dentro de estos procesos la práctica más común es la prospección de compuestos químicos enfocada en los metabolitos secundarios,

posiblemente por el gran auge económico que genera la industria farmacéutica [3]. Con base en lo anterior, el alcance del presente proyecto se circunscribe a la exploración de los PN vegetales de la especie objeto de estudio, su actividad antibacteriana *in vitro* y la elaboración de un producto a partir de la fracción lipídica de los frutos, sin incluir prácticas de conservación de cultivos *in situ* ni *ex situ*. Relacionado con este aspecto, es de resaltar que en el lugar donde se obtuvo la muestra (Puerto López, Meta), se encuentra bien distribuida la planta con un número representativo de árboles, lo cual permitió un fácil acceso y recolección de las cantidades necesarias de cada uno de los órganos de la planta para su investigación.

Las Lauraceae son una gran familia de plantas leñosas (excepto las que pertenecen al género *Cassytha*), se encuentran representadas entre 2500 a 3000 especies distribuidas en aproximadamente 55 géneros, 27 de ellos en América [4,5]. En Colombia existen especies de los diferentes géneros en nuestros bosques, principalmente las pertenecientes al clado Perseeae-Laureae [6] y de acuerdo con el Herbario Nacional Colombiano el género *Ocotea* cuenta con el mayor número de especies registradas en el país (30.4 % del total de las especies de esta familia en Colombia). Entre los usos en la medicina tradicional a las Lauráceas se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, por ejemplo para aliviar los síntomas de la gota y artritis, antidiarreicas, cicatrizantes, antisépticas, vermífugas, contra enfermedades de la piel y antimaláricas, entre otras [7, 8]. Estas actividades biológicas se convierten en insumos que incitan a la investigación química de PN en un momento en que la ciencia se orienta al desarrollo de nuevas estrategias que ayuden a descubrir las riquezas no exploradas en la medicina tradicional con criterios de sostenibilidad ambiental y vinculación de nuevas tecnologías [9].

Las propiedades medicinales antes mencionadas se pueden atribuir a las sustancias producto del metabolismo secundario de la planta, que en el caso de la familia Lauraceae son reconocidas por su gran variedad con actividades biológicas evaluadas. Los metabolitos más frecuentemente encontrados en la familia Lauraceae son los que corresponden a núcleos del tipo lignanos, neolignanos, alcaloides, flavonoides y terpenos. En cuanto a los lignanos y neolignanos han presentado actividad citotóxica frente a líneas celulares cancerígenas, actividad antimalárica y antiinflamatoria, tal es el

caso de la ocobullenona extraída de la corteza de *Ocotea bullata* [10,11]. Los alcaloides presentan una excelente actividad antimicrobiana [12] y antiprotozoaria [13], mientras que los aceites esenciales muestran actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica [14 – 16].

Teniendo en cuenta este contexto, se hace necesario incrementar las investigaciones de esta familia en el país con el fin de contribuir al estudio químico de la misma y de esta forma, aportar al progreso de su clasificación sistemática en general. En este sentido, el presente trabajo busca contribuir al conocimiento de la composición química y de las actividades biológicas de las especies de la familia Lauraceae, orientando el estudio hacia la exploración de metabolitos secundarios a partir diferentes órganos de un espécimen de *Ocotea caudata* (Nees) Mez., del que se encuentra escasa información fitoquímica, con posibilidades de obtener nuevos PNs o compuestos ya conocidos a partir de una nueva fuente vegetal, y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos. También se planteó realizar transformaciones estructurales a por lo menos un metabolito aislado con el fin de indagar si existe algún efecto (o ninguno) de estas modificaciones en la actividad antibacteriana.

Los resultados expuestos en este documento aportan al conocimiento químico del género *Ocotea* y la familia Lauraceae. De las hojas de la especie se obtuvieron 26 compuestos, de los cuales dos alcaloides: uno de tipo aporfínico la (+)-3-hidroxi α -muciferina (**Oc-18**) y otro derivado de la prolina la (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**) y una flavona: la 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona se reporta por primera vez en la familia. El alcaloide aporfínico (+)-9-*O*-demetilnorpreocoteina (**Oc-21**) es una sustancia sin reportes previos en la literatura. La actividad antibacteriana de los metabolitos aislados mostraron que los compuestos fenólicos (fenoles simples y flavonoides), ácidos grasos y esteroides inhiben tanto las bacterias Gram positivas (*B. subtilis* y *S. aureus*) como Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*); mientras que los alcaloides aislados y sintetizados únicamente mostraron acción frente a las bacterias Gram positivas, excepto la thalictuberina (**Oc-16**), la 3-*O*-demetilthalictuberina (**Oc-17**), la (+)-3-metoxinordomesticina (**Oc-19**) y la (+)-nordomesticina (**Oc-20**) que mostraron inhibición a una concentración de 2 mg/mL y la isoboldina (**Oc-22**) y boldina (**Oc-23**) que

no presentaron efecto contra ninguna de las bacterias a las concentraciones ensayadas.

El presente manuscrito expone en el capítulo 1 el estado actual del estudio químico de las Lauráceas, haciendo énfasis en el género *Ocotea* y las actividades biológicas realizadas a los compuestos obtenidos de las plantas. En el capítulo 2 se describe la metodología llevada a cabo para el tratamiento de las hojas de *O. caudata*, de dónde se aislaron 26 compuestos, uno de ellos nuevo con esqueleto de alcaloide aporfínico, la comparación de la composición química entre los extractos de los diferentes órganos de la planta, el análisis del aceite esencial de las hojas y de la fracción lipídica de los frutos y cáliz y la modificación estructural de uno de los metabolitos aislados y posteriormente se realizó la actividad antibacteriana tanto de los compuestos aislados como de los sintetizados. En el capítulo 3 se detallan los resultados de la composición química de los órganos de la planta, modificación estructural y actividad antibacteriana. El capítulo 4 contiene las conclusiones y perspectivas de esta tesis.

1.Estado actual del tema

La identificación de las especies de la familia Lauraceae es uno de los procesos más difíciles de realizar. Para iniciar, esta familia es muy diversa y su taxonomía es compleja, principalmente porque sus flores son tan pequeñas que no permiten fácilmente su ubicación sistemática [4,6]. Los adelantos científicos apuntan a la clasificación de especies vegetales no solo por su morfología, sino también por las características de tipo genómico de las plantas [5]. De acuerdo con esto, en el 2001 se realizó una clasificación de la familia Lauraceae, teniendo en cuenta las claves taxonómicas y la variación secuencial genómica del ADN del cloroplasto y el núcleo de la célula vegetal. En este estudio se seleccionaron 122 especies representantes de 44 géneros (de los 55 que existen) [6]. En este análisis se establecieron 4 grandes clados (*Perseeae-Laureae*, *Chlorocardium-Mezilaurus*, *Neocinnamomum-Cassytha-Caryodaphnopsis*, *Cryptocaryae*), mediante la comparación de las especies encontradas como emparentadas. El género *Ocotea* pertenece al clado *Perseeae-Laureae* [6]. Estas anotaciones son importantes de resaltar teniendo en cuenta que la clasificación y determinación de la especie objeto de trabajo es una de las primeras actividades que se debe realizar en prácticas de bioprospección, seguido por una exploración de su conocimiento etnobotánico que ayuda a orientar los posibles usos del producto una vez se haya integrado el conocimiento tradicional con los hallazgos científicos.

1.1 Generalidades del género *Ocotea*

El clado *Perseeae-Laureae* agrupa la mayor parte de los géneros de la familia Lauraceae, con una amplia distribución en los trópicos de América y Asia. A este clado pertenece el Complejo *Ocotea* que agrupa trece géneros (*Endlicheria*, ***Ocotea***, *Aniba*, *Kubitzkia*, *Licaria*, *Pleurothyrium*, *Paraia*, *Nectandra*, *Aiouea*, *Dicypellium*,

Rhodostemonodaphne, *Urbanodendron* y *Umbellularia*), siendo las especies del género *Ocotea* las más estudiadas y diversas [4,6].

1.1.1 Taxonomía y distribución del género *Ocotea*.

El género *Ocotea* pertenece a la familia Lauraceae (orden Laurales), una de las familias más primitivas de las angiospermas ya que se han encontrado registros fósiles desde el periodo Cretáceo [6]. El género *Ocotea* fue descrito por Fusée Aublet en 1775, se caracteriza por sus estambres con 4 lóculos, ubicados en 2 pares, las flores son dioicas o perfectas y carecen de papilas en los estambres o sépalos en la mayoría de las especies. De esta manera, la identificación de *Ocoteas* no es un proceso que este muy bien definido, sin embargo la mayoría de las Lauráceas que se encuentran en América pertenecen a este género. La Figura 1-1 muestra el árbol, hojas, flores y fruto de *Ocotea caudata* colectada en Puerto López, Meta. En el planeta existen alrededor de 350 especies de árboles y arbustos que habitan en regiones tropicales y subtropicales. Según el Herbario Nacional Colombiano, en Colombia existen alrededor de 56 especies del género *Ocotea*, distribuidas a lo largo del territorio nacional, esto corresponde al 0.16% del total de las especies reportadas a nivel mundial [17]. En la Figura 1-2 se aprecia la distribución de la *O. caudata* en América. Según la clasificación del sistema APGIII (el grupo filogenético de las angiospermas), las *Ocoteas* se clasifican dentro de la subclase Magnoliids o Magnoliidae, orden Laurales y familia Lauraceae [18].



Figura 1-1. Fotografía de la especie *Ocotea caudata*. Cortesía: Wilman Delgado. **A.** Hojas alternas, simples con márgenes enteras. **B.** Inflorescencias en panículas. Flores pequeñas, blancas o amarillas y dioicas. **C.** El fruto es una drupa, cáliz deciduo [5].



Figura 1-2. Distribución de la especie *Ocotea caudata* en América. El color amarillo representa la presencia de la especie en el territorio [19].

1.1.2 Etnobotánica del género *Ocotea*

De todos los géneros de la familia Lauraceae, el *Ocotea* merece un renglón especial gracias a la gran cantidad de especies a las que se les atribuyen diferentes usos. La madera presenta características muy valoradas por su excepcional durabilidad, color u olor que las hace útiles en labores de ebanistería, construcción de postes, vigas, pisos y muebles. Un ejemplo particular, es el caso de *O. barcellensis* el aceite obtenido haciendo agujeros en su madera es usado para reemplazar el kerosene en algunas regiones de Sur América [8].

En la medicina tradicional, el género *Ocotea* también se caracteriza por presentar mayor número de especies con estas aplicaciones. La Tabla 1-1 relaciona el órgano de la especie con la forma de uso y la utilidad.

Tabla 1-1. Especies del género *Ocotea* utilizadas en la medicina tradicional.

Nombre científico	Parte utilizada	Forma de uso	Propiedades medicinales	Ref.
<i>O. aciphylla</i>	Hojas	Infusiones	Tónico y estomacal	8
	Corteza		Antirreumática y depurativa	8
	Corteza	Resina	Dolores musculares	20
<i>O. barcellensis</i>	Madera	Aceite	Pitiriasis	8
<i>O. bullata</i>	Corteza	Infusión	Dolores de cabeza, de espalda,	10

Nombre científico	Parte utilizada	Forma de uso	Propiedades medicinales	Ref.
			problemas del tracto urinario	
<i>O. caparrapi</i>	Hojas, madera	Aceite, infusión	Picaduras de insectos, mordeduras de serpientes, bronquitis y tumores cancerígenos	21
<i>O. cymbarum</i>	Madera	Extracto	Anquilostomiasis	8
<i>O. guianensis</i>	Corteza y hojas	Infusión	Abscesos	8
<i>O. indecora</i>	Corteza del tallo o raíz	Aceite	Sudorífica, antirreumática y antisifilítica	8
<i>O. lancifolia</i>	Hojas	Infusión	Antiparasitario	13
<i>O. pretiosa</i>	Madera	Extracto	Anquilostomiasis	8
<i>O. pulchella</i>	Corteza y hojas	Infusión	Emenagogo estomacal, y tónico del útero	8
<i>O. quixos</i>	Cáliz	Aceite	Desinfectante, anestésico local y antidiarreico	22
<i>O. spectabilis</i>	Corteza y raíz	Infusión	Tónico astringente	2
<i>O. teleiandra</i>	Corteza	Infusión	Dolores en el pecho	8
	Hojas		Sudoríficas	8

1.1.3 Generalidades de la especie *Ocotea caudata*

La especie *O. caudata* (Nees) Mez., también es conocida por los Basiónimos de *Ocotea cernua* (Nees) Mez., y *Oreodaphne cernua* Nees [17, 19]. En la región del pacífico colombiano, se le conoce con el nombre de “jigua negro” o “jigua baboso”, en los llanos orientales “amarillo” o “laurel” y en Antioquia como “laurel”. En estas regiones y en el mundo, la madera de la planta es muy apreciada por su calidad y la tala de estos árboles ha llegado al punto que hoy se encuentran en libros rojos y en listados de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) [23], también es usada como cerca viva (ver Figura 1-1, izquierda), tal es el caso de algunas comunidades del Meta (sitio donde fue recolectada la muestra objeto de estudio del presente trabajo).

En el Perú tiene varios nombres comunes: “Moena”, “Moena blanca”, “Roble”, “Roble blanco” y “puchugero” y en el Brasil “lauro-preto”. La madera es semidura, lo que la hace trabajable y durable, es muy apreciada para labores de carpintería y ebanistería [24]. En México se conoce como Laurelillo y se usa principalmente como leña [25]. La

O. caudata puede ser confundida con la tradicionalmente conocida palo de rosa (*Aniba roseadora*), existe un reporte en el que denominan a su aceite esencial como “cayeno de palo de rosa” [26].

Sobre la *Ocotea cernua* existe un estudio donde se evaluó el extracto en diclorometano de la corteza y raíz frente a *Mycobacterium tuberculosis*, a una concentración de 50µg/mL, mostrando menos del 50% de inhibición [27].

Teniendo en cuenta lo anterior, la planta objeto de este trabajo se seleccionó debido a la escasa información fitoquímica que existe sobre ella, no obstante los antecedentes acerca de las importantes actividades biológicas en especies del mismo género indican un campo promisorio de estudios más allá del uso tradicional que se le da actualmente como fuente maderable y cerca viva.

1.1.4 Metabolitos secundarios presentes en algunas especies del género *Ocotea* y su actividad biológica.

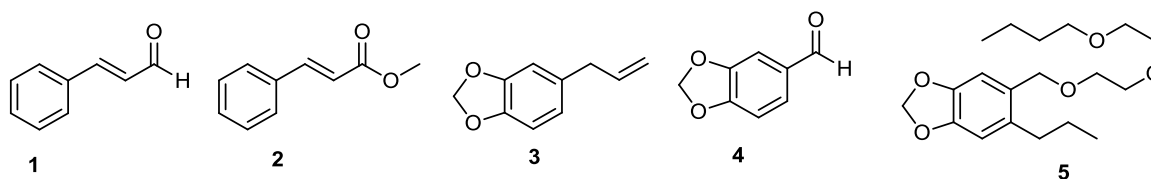
El grupo de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia (Unal), en cabeza de su director el Dr. Luis Enrique Cuca, ha liderado en el país el estudio de Lauráceas con el ánimo de generar nuevo conocimiento que aporte a la fitoquímica de esta familia de plantas.

Entre los metabolitos secundarios caracterizados del género *Ocotea*, se encuentran fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, alcaloides y terpenos. Algunos de ellos se listan a continuación:

1.1.4.1 *Fenilpropanoides.*

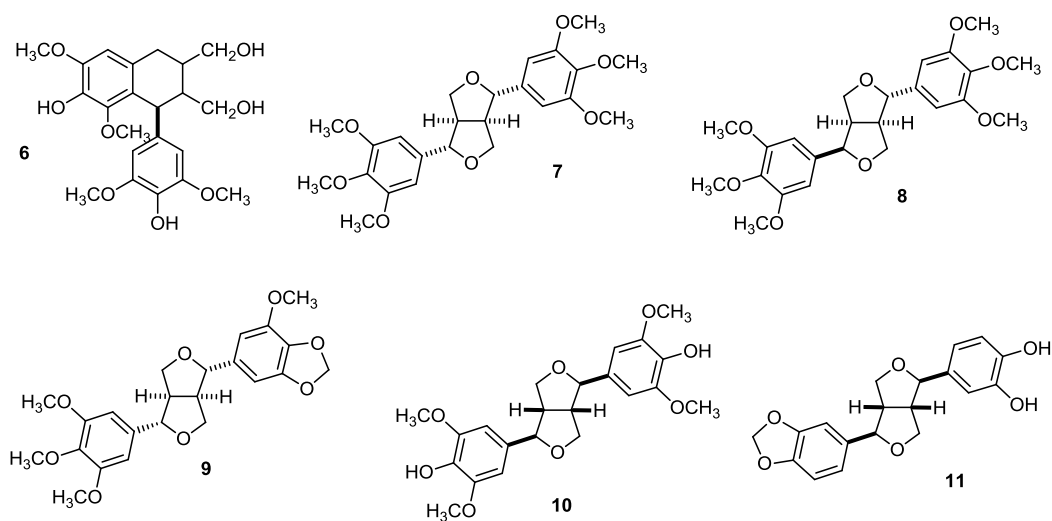
En *Ocotea*, los fenilpropanoides se encuentran generalmente en los aceites esenciales obtenidos de la corteza y las hojas de la planta. Un ejemplo de fenilpropanoide es el cinamaldehído, el cual es el responsable del olor de la canela. El aceite esencial de *O. quixos* contiene principalmente *trans*-cinamaldehído (**1**) y cinamato de metilo (**2**), a los que se les atribuyen las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias,

antiplaquetarias y antitrombóticas. [22,28 – 30]. El safrol (**3**) es el principal componente del aceite de sasafrás, obtenido de *O. fragrantissima*, *O. odorifera* y *O. pretiosa*, es utilizado como plantilla para la síntesis de piperonal o heliotropina (**4**), el cual se usa en la síntesis del butóxido de piperonilo (**5**), un coadyuvante en la acción de algunos insecticidas [31].

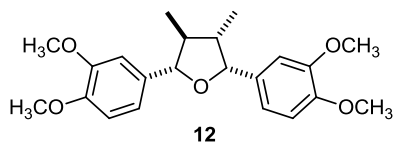


1.1.4.2 Lignanos.

En cuanto a los metabolitos del tipo lignoides, los neolignanos son los que presentan una mayor diversidad estructural y presencia en las Lauráceas, contrario a lo que sucede con los lignanos [32]. Sin embargo, el lioniresinol (**6**) fue aislado de *O. cymbarum* [33] y *O. minarum* [34]. Los lignanos furofuránicos yangambina (**7**), epiyangambina (**8**), sesartemina (**9**), episesartemina, siringaresinol (**10**), 4'-O-demetilepiyangambina y (+)-4'-O-demetilepimagnolina A (**11**) fueron aislados de hojas de *O. duckei*. Estudios farmacológicos demuestran que la yangambina presenta varios efectos como: antagonista del PAF (factor activador de plaquetas), protección contra colapsos cardiovasculares y choques anafilácticos, propiedades antialérgicas, actividad analgésica y depresor del sistema nervioso central [35,36].



La (\pm)-veraguensina (**12**) fue aislada por primera vez de *O. veraguensis* en México [37]. En un programa de tamizaje realizado por *Merck Research Laboratory*, donde se ensayó la inhibición de PAF, concluyó que este producto natural tiene un potencial antagonista del PAF. Por lo tanto, se han ensayado varios estereoisómeros de ella, siendo los isómeros *cis* los que mostraron la mayor acción. Sin embargo como sucede con las especies de *Ocotea*, la mayoría de los lignoides aislados de estas plantas son neolignanós del tipo biciclooctánicos y benzofuránicos [38].



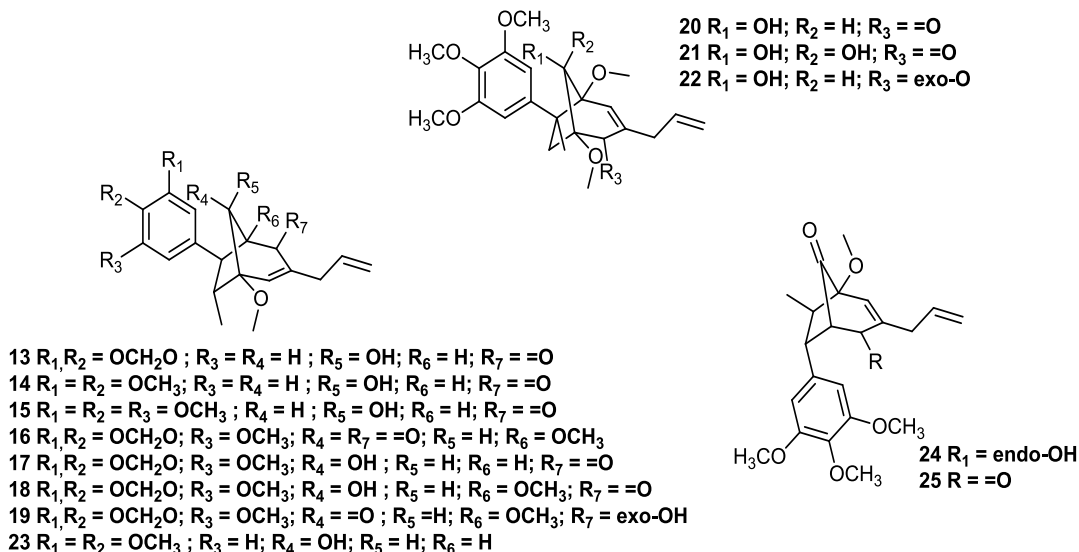
1.1.4.3 Neolignanós.

Debido a la frecuencia con que se presentan en las Lauráceas, los neolignanós son el principal grupo biogénico de la familia y por lo tanto del género *Ocotea*, en especial los que tienen el núcleo biciclooctánico y benzofuránico [32,38,39]. Estos metabolitos también son de gran importancia por sus actividades biológicas como antioxidantes, antihipertensivos, hepatoprotectores, antibacterianos, antifúngicos y citotóxicos [40].

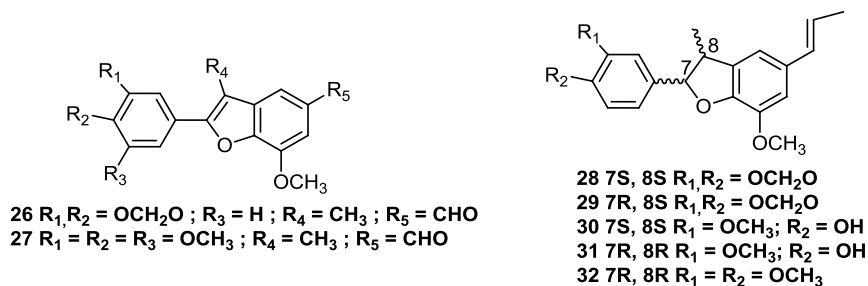
El grupo de investigación en productos naturales vegetales de la Unal ha aportado al conocimiento de los neolignanós, al estudiar varias especies de Lauráceas. A manera de ejemplo se citan algunas especies del género *Ocotea* y el metabolito encontrado:

- ***O. macrophylla*** [11,41]: los neolignanós listados a continuación se aislaron de las hojas de esta planta. Los neolignanós benzofuránicos muestran mayor actividad antiinflamatoria e inhibición de PAF.

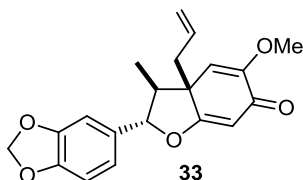
Neolignanós tipo biciclooctano: ocofilol A-C (**13-15**), cinerinas A-D (**16-19**), nectamazinas A–C (**20-22**), kadsurenina C (**23**), macrofilina B (**24**) y 4'-oxo-macrofilina B (**25**).



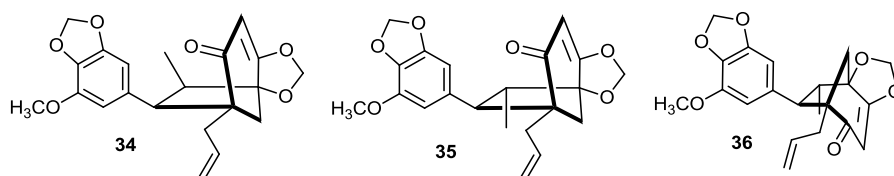
Neolignanos relacionados a la conexión 8.5',7.O.4': ocofilal A-B (**26-27**), (-)- y (+)-licarina B (**28-29**), (-)- y (+)-licarina A (**30-31**) y (+)-acuminatina (**32**), entre otros.



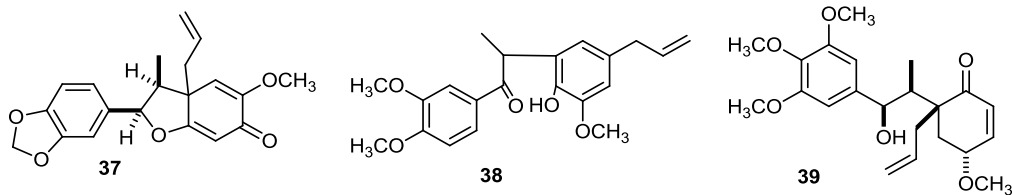
- **O. elegans:** del tallo de esta planta se aisló la burchellina (**33**) que ha logrado producir efectos sobre vectores de propagación del *Trypanosoma cruzi*; responsable de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica [40]. La burchellina también ha sido aislada de la corteza de *O. cymbarum* [42].



- ***O. catharinensis*** [43,44]: Esta planta ha sido una de las más estudiadas en Brasil, de sus hojas se obtuvieron 8 neolignanós del tipo benzofuránico y 3 del tipo biciclooctánico.
- ***O. bullata***: de la corteza de esta planta se aislaron tres neolignanós, la ocobullenona (**34**), la *iso*-ocobullenona (**35**) y el diastereoisómero sibillenona (**36**), que son del tipo biciclooctánico con acoplamientos poco usuales (7.1', 8.3') entre las unidades C₆C₃ [45]. Estos dos metabolitos son los mayoritarios presentes en la corteza por lo que se les considera los agentes activos de las propiedades medicinales que le atribuyen en la región KwaZulu Natal (Sur África), entre ellas actividad antiinflamatoria [10].



- ***O. porosa***: en esta planta se encontraron 35 neolignanós en las hojas y corteza, la mayoría del tipo benzofuránicos y biciclooctánicos [46]. La porosina (**37**), la carinatona (**38**) y la megafona (**39**) mostraron propiedades citotóxicas [47].

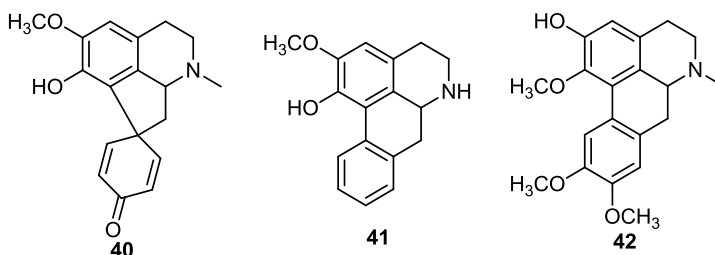


1.1.4.4 Alcaloides.

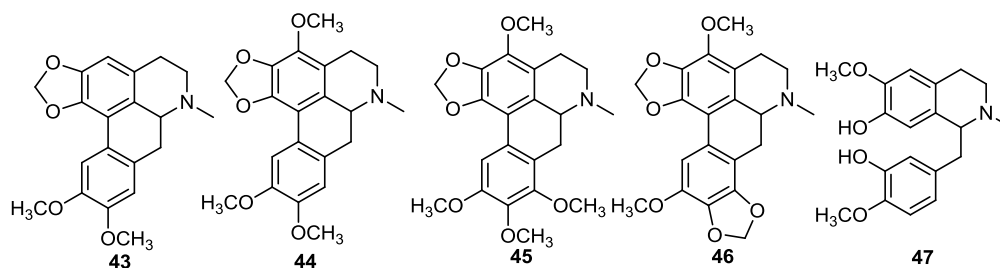
Las especies de la familia Lauraceae (incluyendo las del género *Ocotea*) han sido reconocidas por años como fuente de alcaloides y probablemente los del tipo aporfínicos y benciltetrahidro/isoquinolínicos son los más frecuentemente encontrados [32]. Esta clase de metabolitos se consideran importantes por las actividades farmacológicas que se les han atribuido, las cuales se deben principalmente a los efectos antagonistas a la dopamina [48,49].

A nivel taxonómico es posible, aunque no está comprobado, que la presencia de lignanos, neolignanos y alcaloides pueda tener algún sentido filogenético dado el gran número de ocasiones en que han sido hallados en la familia. Algunos alcaloides aislados de especies de *Ocotea* se relacionan a continuación:

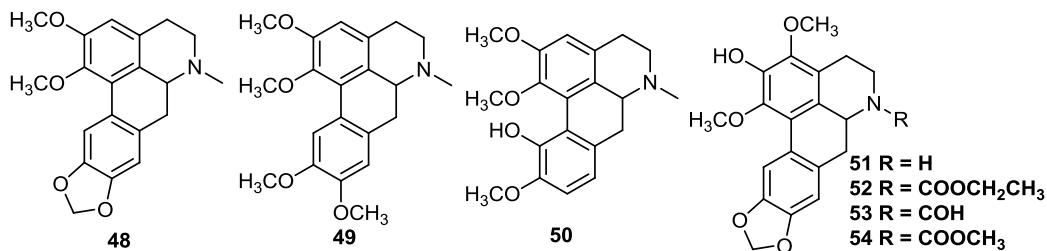
- ***O. glazovii*** [18,50]: de esta planta se obtuvo la glaziovina (**40**), que es el alcaloide más importante obtenido de fuentes vegetales Sur Americanas. Es un alcaloide proaporfínico conocido comercialmente como “Suavedol” con propiedades neurofarmacológicas como tranquilizante y ansiolítico. También se encontró la caaveina (**41**) y la asimilobina (**42**) [51]. Se ha comprobado que la caaveina, que también fue obtenida de ***O. lancifolia***, tiene una interesante actividad antiprotozoaria contra *Leishmania* y *T. cruzi* [13].



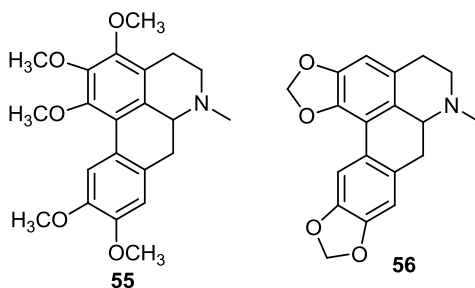
- ***O. vellosiana*** [51,52]: de los frutos se encontraron trece alcaloides del tipo aporfínicos y bencil/isoquinolínicos, entre los aporfínicos están la (+)-dicentrina (**43**) que inhibe la topoisomerasa II y presenta actividad antineoplásica, la ocoteína (**44**), la leucoxilonina (**45**), la ocotominarina (**46**), y el bencil/isoquinolínico (±)-reticulina (**47**). Al parecer solo los alcaloides 1,2,9,10-tetraoxigenados (como la dicentrina) tienen mayor representación en la planta. La reticulina, que también ha sido aislada de ***O. duckei***, mostró excelentes actividades neurofarmacológicas ya que presenta una acción depresora del sistema nervioso central [53].



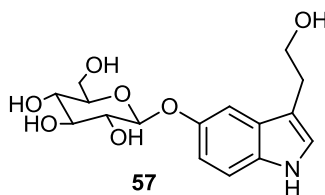
- ***O. macrophylla*** [12,51,54]: de la madera y la corteza de esta planta se obtuvieron los siguientes alcaloides aporfínicos; nantenina (**48**), glaucina (**49**), isocoridina (**50**), (S)-3-metoxinordomesticina (**51**), (S)-N-etoxicarbonil-3-metoxinordomesticina (**52**), (S)-N-formil-3-metoxinordomesticina (**53**) y (S)-N-metoxicarbonil-3-metoxinordomesticina (**54**).



- ***O. acutifolia*** [55]: de las hojas y la corteza de esta planta se aislaron 15 alcaloides aporfínicos y un alcaloide morfinoide, entre ellos se encontró la (+)-thalicsimidina (**55**) y la (+)-neolitsina (**56**). Algunos de los alcaloides aporfínicos se probaron contra líneas celulares cancerígenas con resultados significativos en la acción. Se encontró que cuando está presente el grupo funcional N-óxido y cuando el carbono en la posición 8 (C₈) presenta un sustituyente hidroxilo, la actividad citotóxica disminuye.

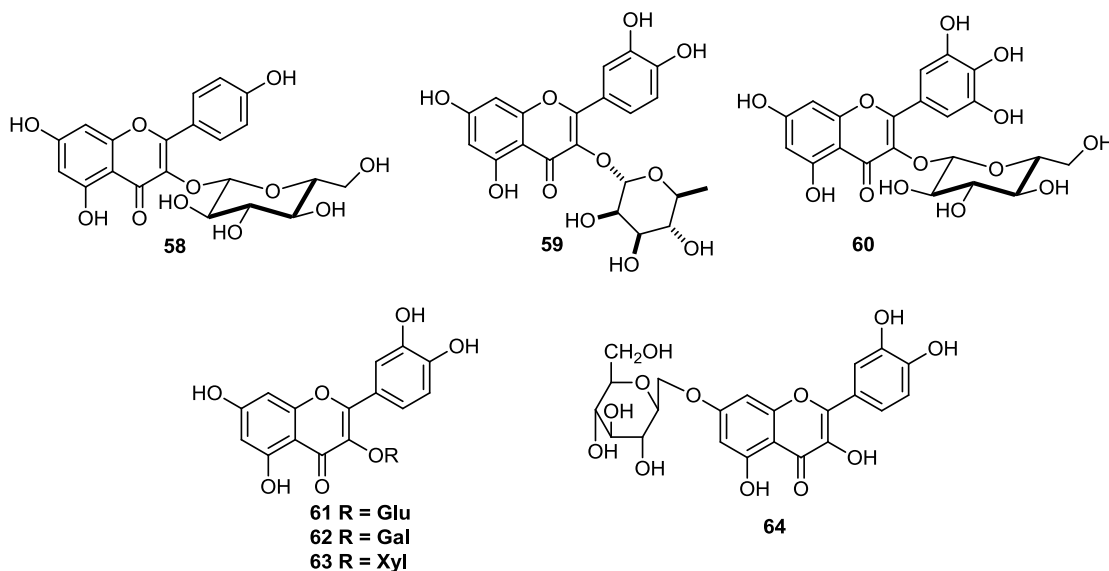


- ***O. minarum*** [34,38]: Además de la dicentrina (**43**), la ocoteína (**44**), la ocotominarina (**46**) y otros, de las hojas de esta planta se aisló un alcaloide indólico el 5-O-glucósido de triptofol (**57**).



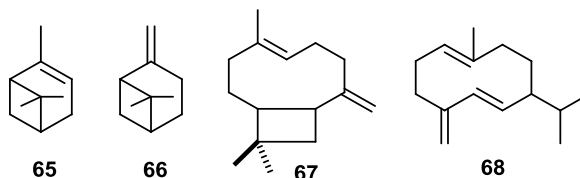
1.1.4.5 Flavonoides

A pesar de que los flavonoides se encuentran bien distribuidos en las plantas, la información sobre este tipo de metabolitos en las Lauráceas es limitada si se tiene en cuenta la cantidad de especies de la familia, se han reportado solamente en 12 géneros de los cerca de 55 que existen. Los núcleos de esta clase más comúnmente encontrados son los flavonoles, particularmente los derivados del Kaempferol y la quercetina. Estos compuestos han sido reportados en especies de *Actinodaphne*, *Beilschmiedia*, *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Laurus*, *Litsea*, *Machilus*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Persea* y *Umbellularia*. En algunas especies de *Ocotea* se ha visto la presencia de flavonoles 3-O-glicosilados; por ejemplo, en hojas de *O. vellosiana* se obtuvieron flavonoides glicosilados como la astragalina (3-O-glucósido de Kaempferol) (**58**), la quercitrina (3-O-ramnósido de quercetina) (**59**) y la hirsutrina (3-O-glucósido de myricetina) (**60**) [52]. De las hojas de *O. corymbosa* se aisló el 3-O-glucósido de quercetina (**61**), el 3-O-galactósido de quercetina (**62**) y el 3-O-xilulósido de quercetina (**63**) [56]. De los frutos de *O. minarum* se aislaron tres flavonoides entre ellos la taxifolina (7-O-glucósido de quercetina) (**64**), que es de menor toxicidad comparado con la quercetina y actúa como un potencial agente quimiopreventivo [34].



1.1.4.6 Aceites esenciales.

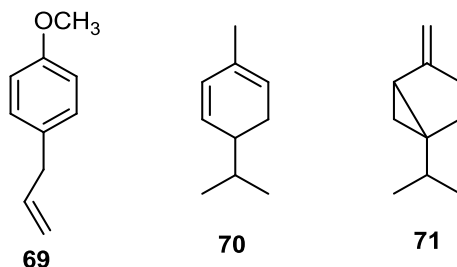
Un estudio de la composición del aceite esencial de 10 especies del género *Ocotea* originarias de Costa Rica, mostró en todas las plantas, la presencia de monoterpenos (α -pineno (**65**) y β -pineno (**66**)) en menor proporción y los sesquiterpenos β -cariofileno (**67**) y germacreno-D (**68**) en mayor abundancia, la existencia de estos dos últimos corroboran lo expuesto por Gottlieb [32] sobre los sesquiterpenos en la familia Lauraceae [32,57].



La *O. quixos* es la especie a la que más se le han realizado estudios de sus aceites esenciales. Un trabajo sobre el aceite esencial obtenido de los cálices se basó en la actividad inhibitoria de agregación de plaquetas (PAF), mostrando excelentes resultados concluyentes que indican su potencial y segura actividad antitrombótica atribuible al *trans*-cinamaldehído (**1**), el cual es el compuesto mayoritario [28]. Otras actividades evaluadas *in vitro* fueron su actividad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) y ensayos de decoloración de β -caroteno, mostrando con el DPPH que el aceite puede actuar como un buen donador de hidrógenos o de electrones, mientras que inhibe débilmente la oxidación del ácido linoleico. Con resultados muy positivos (comparables con los del aceite esencial de *Thymus vulgaris*), se probaron las actividades antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y los hongos *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* (un tipo de levadura), *Pythium ultimum* (una especie de saprófito) y *Trichophyton mentagrophytes* [31]. También es una realidad que los aceites esenciales de *O. quixos* presentan actividad antiinflamatoria, por lo que se considera al *trans*-cinamaldehído un original agente antiinflamatorio con propiedades gastroprotectoras [28].

Las mismas actividades mencionadas para el aceite esencial de *O. quixos*, se evaluaron en el aceite de *O. bofo* obtenido de los cálices, con resultado similares. Sin embargo,

los componentes son diferentes, siendo el estragol (**69**), el α -felandreno (**70**) y el sabineno (**71**) los mayoritarios, con una abundancia relativa del 48.7%, 19.6% y 10.4% respectivamente [16].



En los aceites esenciales de hojas y corteza de *O. gomezii* y *O. morae* se encontró, al igual que con los anteriores aceites mencionados, una composición predominante de sesquiterpenos y solo en un caso (hojas de *O. morae*) se encontraron, en muy bajas proporciones (< 1%), compuestos aromáticos como el benzaldehído, ésteres del benzoato de bencilo y salicilato de bencilo. En este caso se determinó la citotoxicidad del aceite esencial frente a ocho líneas celulares y células no-tumorales (*Vero*). Los resultados mostraron una citotoxicidad relativa, debido a que podría ser tóxico tanto para las células tumorales como para las no tumorales [58].

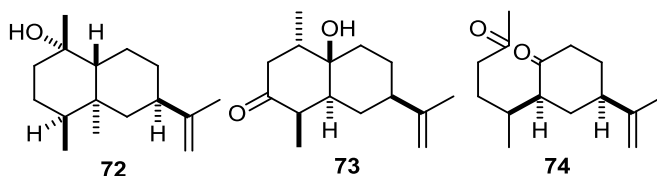
1.1.4.7 Terpenos

Los terpenos han sido bien descritos en las Lauráceas. Sin embargo, estos metabolitos en la mayoría de los casos se encuentran en los aceites esenciales de la planta. De los frutos de *O. corymbosa* se aislaron 5 sesquiterpenoides del tipo eudesmanolido, tres ejemplos se listan a continuación [59]:

rel-(1*S*,4*S*,5*R*,7*R*,10*R*)-10-demetil-1-metil-11-eudesmeno (**72**),

rel-(1*S*,4*R*,5*R*,7*R*,10*R*)-10-demetil-10-hidroxi-1-metil-3-oxo-11-eudesmeno (**73**) y

rel-(5*R*,7*R*)-10-desmetil-1-metil-1,10-dioxo-1,10-seco-11-eudesmeno (**74**).



1.1.5 Panorama de la modificación de los productos naturales para mejorar sus propiedades biológicas.

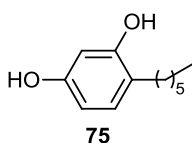
Es innegable el aporte de las plantas a la humanidad, durante siglos el hombre las ha usado por su valor nutricional, para aliviar dolencias, como materias primas para textiles, construcción, entre otras. En cuanto a su uso en la medicina tradicional, de acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), alrededor de tres cuartos de la población mundial utiliza las plantas para fines medicinales en tratamiento de artritis, epilepsia, asma, infecciones, etc. Gracias a los adelantos en la química, la biología y la bioquímica, se ha logrado atribuir estas propiedades a los metabolitos secundarios presentes en los órganos de las plantas [60]. Estas moléculas bioactivas, son en su mayoría de tres tipos *isoprenoides*, *alcaloides* y *fenilpropanoides* con sus derivados. Sin embargo, existe un interés especial por estos últimos, los cuales desempeñan funciones importantes como ser precursores de una amplia gama de antibióticos que incluyen fitoalexinas con núcleos de furanocumarinas, pterocarpanos, estilbenos y flavonoides [61].

Dadas estas razones, es indiscutible el papel de los productos naturales (PNs) vegetales como fármacos. No obstante, las compañías farmacéuticas han optado por el uso de medicamentos sintéticos, los cuales tienen diferencias significativas con el producto natural. Los PNs presentan una composición molecular diferente ya que contienen menos átomos de nitrógeno, halógenos, o azufre, con un número considerable mayor de oxígenos y más grupos donadores de hidrógeno, tienen más anillos, más centros quirales y especialmente una mayor complejidad estérica [62]. En este sentido, la modificación de los productos naturales mediante diferentes vías sintéticas, ha proporcionado fármacos semisintéticos que conducen a actividades biológicas específicas. Es importante identificar el segmento químico de la molécula responsable de la acción biológica, esta actividad depende del tamaño, la forma y grado de ionización de la molécula, estos parámetros se estudian creando análogos o modificaciones de la molécula original [63].

Existen varias alternativas para realizar estas transformaciones. A continuación se citan algunas de ellas [63]:

- Formar una serie homóloga, en la que la diferencia con la molécula original es el aumento en la fórmula molecular. Normalmente, cuando las cadenas alquílicas son menores la actividad disminuye, esta determinación brinda información valiosa sobre el coeficiente de partición y la acción biológica, por ejemplo en los n-alquilresorcinoles la mejor actividad frente a *Bacillus thyposus* es para el hexilresorcinol (**75**) [63].

-



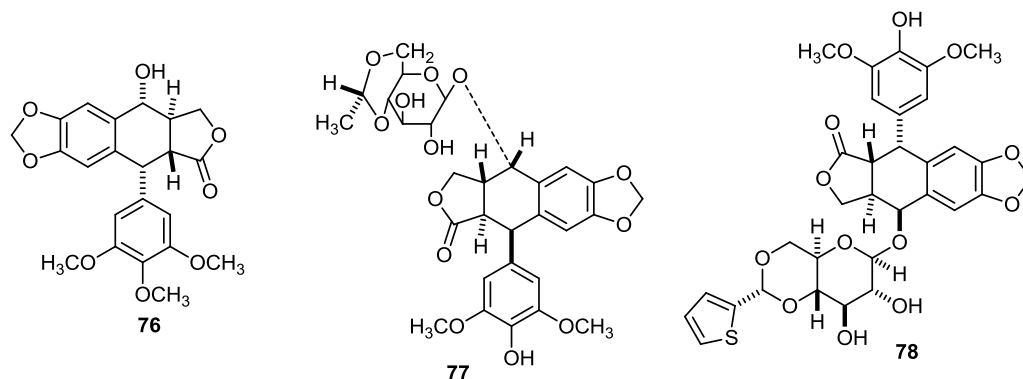
- Eliminar grupos funcionales, o una parte de una molécula puede conducir a modificaciones en la actividad biológica y resultar más fácil su síntesis. Tal es el caso cuando se tiene un producto natural que ha mostrado alguna acción biológica importante y nueva, pero que su producción es costosa económica y ecológicamente hablando. En este proceso el producto natural es la molécula iniciadora que se utiliza como plantilla. Un ejemplo es la eliminación del grupo carbometoxi en la cocaína para la producción de anestésicos locales como la tropacocaína [63].

- Agregar grupos funcionales también modifica la actividad, esto sucede con la etorfina, un análogo de la morfina que tiene un efecto mil veces más potente [63].

Otro modelo que se relaciona con la búsqueda de antibacterianos son los productos naturales con núcleos β -lactámicos, macrólidos, tetraciclina, entre otros, que son utilizados hoy en día como plantillas para formar análogos semisintéticos con acción antibacteriana [64].

En este contexto, los lignanos también han sido objeto de transformaciones, por ejemplo, los del tipo dibencilbutirolactonas y dibencilbutano tratados con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) en medio ácido normalmente conducen a otros tipos de lignanos [65,66]. Algunos lignanos obtenidos de plantas han sufrido modificaciones,

tal es el caso de la podofilotoxina (**76**), obtenida de especies del género *Podophyllum*, la cual tiene propiedades anticancerígenas. Sin embargo, es muy tóxica para ser utilizada en humanos por lo que al hacer modificaciones en su estructura, se obtuvieron los derivados etopósido (**77**) y tenipósido (**78**), actualmente usados en medicamentos contra el cáncer [67].



En los flavonoides se han logrado hacer transformaciones que incluyen la hidrólisis de flavonoides glicosilados, metilación, desmetilación, deshidrogenación y O-alquilaciones principalmente [68]. Estas investigaciones han estado acompañadas de estudios de relación estructura-actividad (SAR), cuando se evaluaron estas modificaciones frente a algunas actividades como la citotóxica, anticancerígena y antioxidante, encontrándose los mejores resultados para la citotoxicidad, por ejemplo, cuando se tenían grupos hidroxilo en el carbono 5 del anillo A del flavonoide, hidroxilo en 3', metoxilo en 4' en el anillo B y metoxilo en el carbono 3 del anillo C [68].

2. Metodología

2.1 Instrumentos

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C y bidimensionales se obtuvieron en el espectrómetro Bruker Avance 300 operado a 300 y 75 MHz, utilizando como disolvente CDCl_3 y CD_3OD de Merck.

Los espectros de masas de baja resolución fueron obtenidos a través de sistemas de cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplados a espectrometría de masas (GC-MS o HPLC-MSESI). Para la GC-MS se utilizó un equipo Agilent Technologies modelo 7890AGC acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5973 con analizador cuadrupolo, ionización electrónica (IE) a 70 eV en modo *full scan*. En el caso de la HPLC-MSESI se utilizó un equipo Shimadzu Prominence con un detector de arreglo de diodos (DAD) SPD M20A, columna Phenomenex Sinergy RP-C18 de 150 mm x 4,6mm x 5 μm y un espectrómetro de masas LC2020 con analizador cuadrupolar y una interfase de ionización *electrospray* (ESI).

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS-ESI) para los metabolitos aislados se obtuvieron en un espectrómetro de masas Bruker Daltonics microTOF QII acoplado a un cromatógrafo 10Avp Shimadzu, columna Phenomenex Luna C18 de 150 x 2.0 mm, 3 μm , fase móvil A: agua (HCOOH 0,1%) y B: MeOH , en modo gradiente 0-6 min 10%B, 20 min 90% B, 30 min 0% B. Temperatura del Horno 40 °C, Longitud de onda 280 y 330 nm. Interfase de ionización ESI en modo positivo. El flujo del gas de secado y nebulización (N_2) se optimizó en 4,2 y 0,8 L/min, respectivamente. Los voltajes del cono y del capilar se ajustaron a 70 V y 3,0 kV respectivamente. Los datos fueron adquiridos en modo *full-scan* en un rango de masas de 100–800 *umas*. En cuanto a los

compuestos sintetizados, los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en un equipo Agilent Technologies con un detector tipo QTOF modelo 6520, interfase de ionización ESI en modo positivo, inyección directa. La temperatura del gas de secado 300°C y un flujo de 0.3 mL/min. El voltaje del capilar se ajustó a 3,5 kV. Los datos fueron adquiridos en modo *full-scan* en un rango de masas de 50–900 umas.

La rotación óptica específica se midió en un polarímetro automático ADP440+ (Bellingham + Stanley) equipado con una lámpara de sodio operado a 589 nm. El espectro de dicroísmo circular (DC) se obtuvo en un equipo Jasco CD-2095 (Japan Spectroscopic, Tokyo, Japan), con una celda de cuarzo de 1.0 cm.

2.2 Materiales

2.2.1 Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados en las extracciones, particiones y eluciones cromatográficas fueron de grado analítico o técnico, éstos últimos se sometieron a destilación fraccionada y secado. Para los análisis por HPLC se utilizaron disolventes grado espectroscópico, degasificados y filtrados en filtros Millipore 0,2 µm.

2.2.2 Columnas y placas cromatográficas

Para las cromatografías en columna se utilizaron fases estacionarias de sílica gel 60 con tamaño de partículas de 63-120 µm (separaciones por gravedad), de tipo *flash* (CF, sílica gel 60 de 40-63 µm) para las cromatografías en las que se aplica presión y sílica gel 60H para las separaciones con vacío (CLV). Las cromatografías en capa delgada (CCD) se realizaron en cromatoplasas de sílica gel 60 HF₂₅₄ de 0,2 mm de espesor, mientras que las de escala preparativa (CCDP) se realizaron en placas de sílica gel 60 HF₂₅₄ de 1 mm de espesor. Se emplearon reveladores como luz UV (254 y/o 356 nm), vapores de yodo, reactivo de Dragendorff y vainillina/H₂SO₄ seguido de calentamiento.

2.2.3 Material vegetal

En el presente estudio se utilizaron las partes aéreas (hojas, frutos, flores, corteza y madera) de *Ocotea caudata*. Un ejemplar “voucher” reposa en el Herbario Nacional Colombiano, con el número COL544562. Las partes colectadas se secaron a temperatura ambiente, después se pulverizaron y se prepararon los extractos con etanol al 96%. También, de las hojas frescas se obtuvieron los aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor.

2.3 Estudio fitoquímico de *O. caudata*.

2.3.1 Obtención de los extractos de los órganos de *O. caudata*.

Cada uno de los órganos colectados secos y molidos (2250 g de hojas, 1310 g de corteza, 1200 g de madera, 25 g de frutos, 2 g de cáliz y 32 g de flores) se maceraron con etanol al 96% a temperatura ambiente. El disolvente fue evaporado mediante destilación a presión reducida para obtener las siguientes cantidades: 308 g de extracto etanólico de hojas (OcHEtOH); 66,1 g de corteza (OcCEtOH); 27,5 g de madera (OcMEtOH); 17,8 g de frutos (OcFrEtOH); 2,7 g de flores (OcFlEtOH) y 1,4 g de cáliz (OcCálizEtOH).

Los extractos etanólicos de las diferentes partes de la planta se sometieron a ensayos químicos de coloración/precipitación [69] con el fin de considerar la presencia o ausencia de grupos de compuestos de tipo alcaloides, flavonoides, taninos, etc. En este análisis preliminar se destacó la presencia de metabolitos de tipo alcaloide y dado que esta clase de compuestos son quimiotaxones importantes para el género se decidió realizar la búsqueda de estos alcaloides en los extractos. Por lo tanto, el estudio de los extractos se orientó hacia la extracción selectiva de alcaloides y el fraccionamiento clásico con disolventes de diferente polaridad.

2.3.2 Fraccionamiento del extracto de hojas de *O. caudata* con disolventes de diferente polaridad.

El extracto etanólico de hojas de *O. caudata* (OcHEtOH) se dividió en dos porciones; una parte (180 g) para la extracción selectiva de alcaloides y la otra (100 g) para su fraccionamiento por cromatografía en columna con disolventes de diferente polaridad.

100 g de OcHEtOH se fraccionaron mediante un proceso de extracción sólido-líquido en un equipo Soxhlet con éter de petróleo (OcHEdP), CH₂Cl₂ (OcHDCM), éter dietílico (OcHEt₂O), acetato de isopropilo (OcHAcO_iPr) y CH₃OH (OcHMeOH). Luego de la evaporación de los disolventes se obtuvieron las fracciones OcHEdP (15,5 g), OcHDCM (6,3 g), OcHEt₂O (2,1 g), OcHAcO_iPr (9,3 g) y OcHMeOH (44,2 g).

La fracción de OcHEdP (12,0 g) fue fraccionada mediante CLV eluyendo con mezcla de EdP:AcOEt en polaridad creciente (95:5 a 0:100), obteniéndose 5 subfracciones. Debido a la baja polaridad de éstas subfracciones se analizaron por GC-MS obteniéndose la siguiente información: En la subfracción 1 (1,5 g) se identificaron el ácido palmítico (**Oc-1**) y el ácido linoleico (**Oc-2**) principalmente. En la subfracción 3 (2,5 g) se identificó una mezcla (sólido blanco) de tres esteroides; el campesterol (**Oc-3**), el estigmasterol (**Oc-4**) y el β -sitosterol (**Oc-5**) y en la subfracción 4 (750 mg) se obtuvo un sólido blanco identificado como β -sitosterol (**Oc-5**).

La fracción de OcHDCM (4,5 g) fue fraccionada mediante CLV eluyendo con mezcla de CHCl₃:MeOH en polaridad creciente (90:10 a 0:100), obteniéndose 8 subfracciones. De la subfracción 1 (160 mg) por CC con Tolueno:AcOEt (98:2) se obtuvo el 1-triacontanol (**Oc-6**) como un sólido cristalino blanco (37 mg). De la subfracción 3 (95 mg) por CC con CH₂Cl₂:AcO_iPr (95:5) se obtuvo el compuesto *p*-hidroxifenilacetato de etilo (**Oc-7**) como un aceite amarillo (15 mg) y el éster metílico del ácido cóstico (**Oc-8**) como un aceite amarillo (21 mg). De la subfracción 6 (230 mg) por CC con CHCl₃:MeOH (90:10) se obtuvo el ácido cóstico (**Oc-9**) como un sólido amarillo pálido (18 mg).

La fracción de OcHEt₂O (2,1 g) fue fraccionada mediante CLV eluyendo con mezcla de Et₂O:AcOiPr en polaridad creciente (60:40 a 0:100), obteniéndose 9 subfracciones. De la subfracción 1 por CC en CH₂Cl₂:AcOiPr (70:30) se obtuvo la 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona (**Oc-10**) como un sólido amarillo (8,6 mg). De la subfracción 3 (125 mg) por CC con Et₂O:AcOiPr (80:20) se obtuvo el ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**) como un sólido amarillo pálido (11 mg). La subfracción 4 (100 mg) se purificó por CCDP con Tolueno:AcOiPr:MeOH 6:4:2 + 0,1 mL AcOH obteniéndose la quercetina (**Oc-12**) como un sólido amarillo (7,8 mg), la afzelina (**Oc-13**) como un sólido amarillo (9,5 mg) y un sólido amarillo (22 mg) que contiene la mezcla de astragalina (**Oc-14**) e isoquercitrina (**Oc-15**).

Las fracciones OcHAcOiPr y OcHMeOH no hacen parte de este estudio, se recomienda continuar su exploración en posteriores investigaciones con miras a encontrar metabolitos de mayor polaridad a los aislados en las tres primeras fracciones (OcHEdP, OcHDCM y OcHEt₂O). La Figura 2-1 simplifica la metodología para el aislamiento de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de hojas de *O. caudata*.

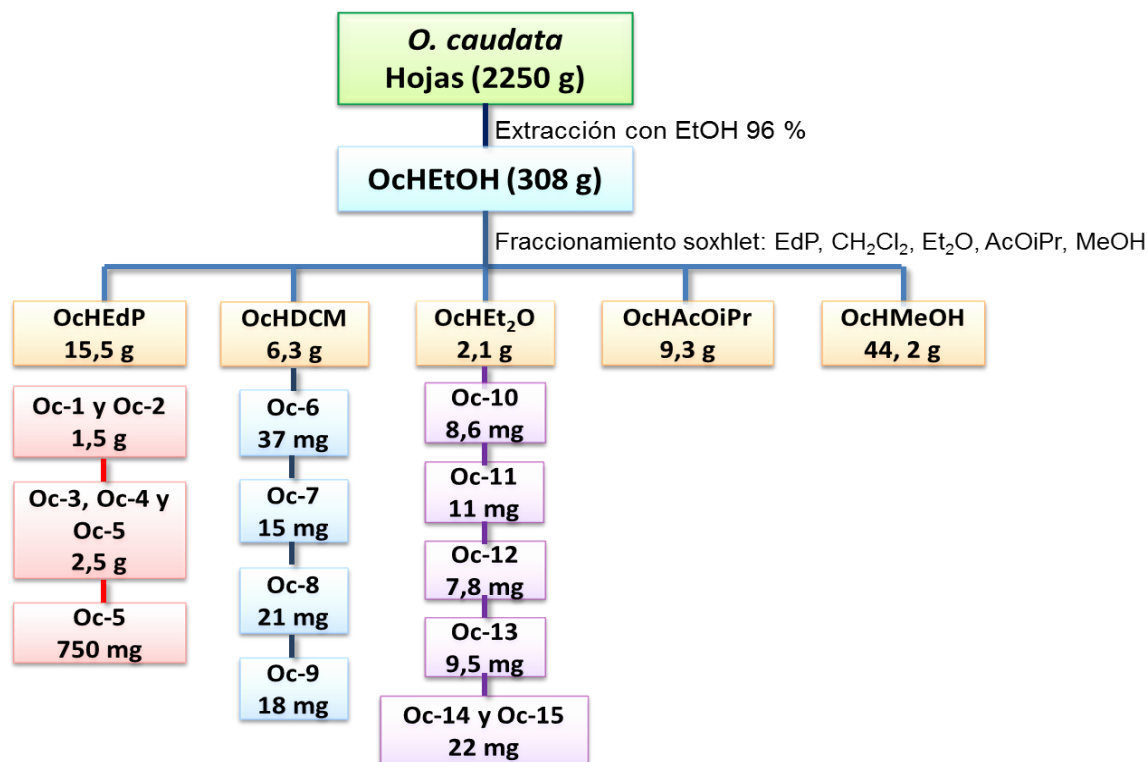


Figura 2-1. Diagrama de la extracción, fraccionamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *O. caudata*.

2.3.3 Obtención del extracto alcaloidal de las hojas de *O. caudata*.

El extracto alcaloidal se obtuvo por extracción ácido-base a partir del extracto etanólico de hojas de la siguiente forma: A 180 g de OCH₂EtOH se le agregaron 200 ml de HCl 10% y 50 ml de acetato de etilo con agitación continua durante 30 min. Posteriormente se agregaron 300 ml de cloroformo, la fase orgánica se retiró y la acuosa se alcalinizó hasta pH 9 con NH₄OH 25 %, luego se extrajo con cloroformo (200 ml, 3 veces). El cloroformo se evaporó a presión reducida resultando 5,0 g de extracto alcaloidal.

2.3.3.1 Fraccionamiento del extracto alcaloidal de las hojas de *O. caudata*.

El extracto alcaloidal (4,0 g) fue sometido inicialmente a cromatografía *flash* (CF) eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH en gradiente de polaridad creciente (100:0 a 70:30) obteniendo 7 fracciones.

La fracción 1 (510 mg) fue purificada mediante CF eluyendo con CH₂Cl₂:MeOH (100:1), obteniéndose 8 subfracciones. De la subfracción 2 (130 mg) se obtuvieron la thalictuberina (**Oc-16**) como agujas amarillo pálido (9,0 mg) y la 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**) como agujas beige (19,0 mg).

La fracción 2 (600 mg) fue fraccionada por CF sucesivas con CHCl₃:MeOH (98:2) obteniéndose la (+)-3-hidroxinordomesticina (**Oc-18**) como sólido amarillo (10,0 mg), la (+)-3-metoxinordomesticina (**Oc-19**) como un sólido amarillo pálido (11,0 mg) y la (+)-nordomesticina (**Oc-20**) como un sólido café pálido (8,0 mg).

La fracción 4 (860 mg) fue purificada mediante CF sucesivas con CHCl₃:MeOH (98:2) obteniéndose un alcaloide nuevo: (+)-9-O-demetilnorpreocoteina (**Oc-21**) como un sólido café (7,0 mg), la (+)-isoboldina (**Oc-22**) como un sólido amarillo pálido (18,0 mg) y la (+)-boldina (**Oc-23**) como un sólido amarillo (19,8 mg).

La fracción 5 (320 mg) fue fraccionada por CF sucesivas con CHCl₃:MeOH (96:4) obteniéndose la (+)-boldina (**Oc-23**) como un sólido amarillo (12,4 mg), la (+)-reticulina (**Oc-24**) como un sólido amarillo (12,0 mg), la (+)-palidina (**Oc-25**) como un sólido verde

(7,8 mg) y la (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**) como agujas incoloras (15,7 mg). La Figura 2-2 resume el procedimiento para el aislamiento de los alcaloides en las hojas de *O. caudata*.

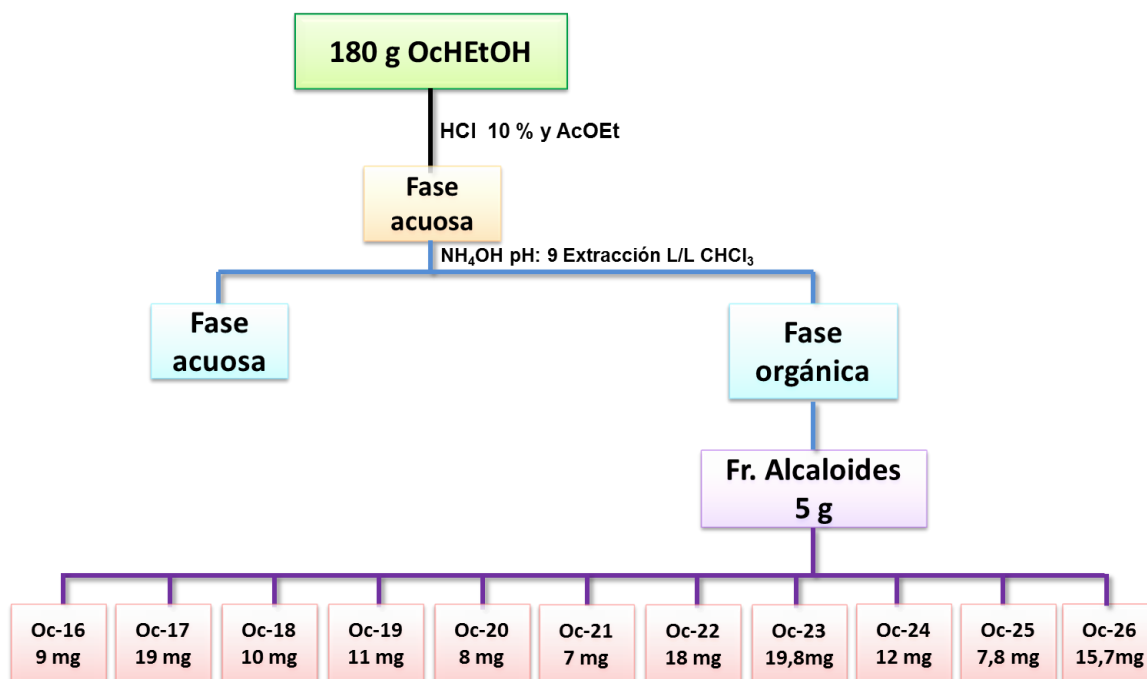


Figura 2-2. Diagrama de la extracción, fraccionamiento y purificación de los alcaloides presentes en las hojas de *O. caudata*.

2.3.4 Estudio comparativo entre los diferentes órganos de *O. caudata* con base en la composición química.

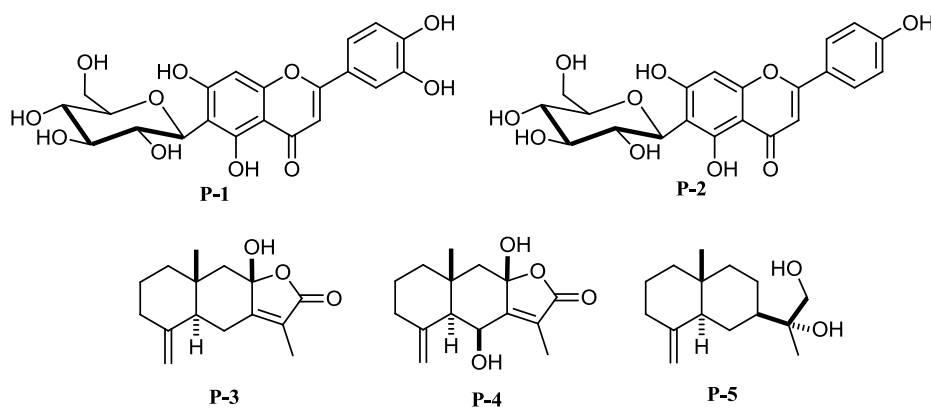
El estudio comparativo entre los diferentes extractos de los órganos de la especie objeto de estudio se llevó a cabo mediante dos procesos: la derreplicación de los compuestos aislados de las hojas y algunos patrones auténticos en los diferentes extractos y el estudio comparativo de los extractos por el método estadístico de análisis multivariado. Para los dos procedimientos se emplearon los datos generados en los equipos HPLC-DAD y HPLC-MSESI bajo las siguientes condiciones:

Se prepararon soluciones de cada uno de los extractos a una concentración 2 mg/mL en metanol y de los compuestos purificados a 0,5 mg/mL que se inyectaron en un cromatógrafo Shimadzu Prominence con detector de arreglo de diodos SPD M20A, columna Phenomenex Sinergy RP-C18 de 150 mm x 4,6mm x 5µm, flujo 0,8 mL /min,

fase móvil A: agua (ATF 0,005%) y B: ACN (ATF 0,005%) en modo gradiente (0-6 min 30%B, 20 min 100% B, 25 min 0% B) Los datos fueron adquiridos cada 1.2 nm entre 190 – 800 nm, la longitud de onda de monitoreo seleccionada fue 270 nm y volumen de inyección de 10 µL. El cromatógrafo además está acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu LC2020, interfase de ionización *electrospray* (ESI) en modo positivo (*scan* 50 – 800 m/z), bloque de calentamiento 400°C, temperatura del línea de desolvatación 250°C, voltaje del detector 1,05 kV, flujo de gas de nebulización (N₂) 1,5 L/min y gas de secado (N₂) 9,0 L/min.

2.3.4.1 Derreplicación de los compuestos aislados de las hojas en los extractos de corteza, madera, frutos, cáliz y flores.

Para la derreplicación se emplearon los metabolitos aislados de las hojas de *O. caudata* (**Oc-7** – **Oc-26**) y cinco patrones auténticos: la *isoorientina* (**P-1**) e *isovitexina* (**P-2**), Sigma-Aldrich, proporcionados por el profesor Geison Costa y el (+)-hidroxiatractilólido (**P-3**), el Ocotealactol (**P-4**) y el kudtdiol (**P-5**) proporcionados por el Laboratorio de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia, que fueron aislados de *Ocotea longifolia* por la Doctora Juliet Prieto en su tesis doctoral [70]. Se seleccionaron estos patrones por su disponibilidad y existencia en especies del género.



Los compuestos aislados (**Oc-7** – **Oc-26**) y los patrones auténticos (**P-1** – **P-5**) se usaron para su derreplicación en los extractos de corteza (OcMEtOH), madera (OcMEtOH), frutos (OcFrEtOH), cáliz (OcCálizEtOH), flores (OcFlEtOH) y hojas (OcHEtOH), para tal fin se emplearon los datos de HPLC-DAD y HPLC-MSESI.

Los resultados obtenidos en el equipo HPLC-MSESI fueron convertidos al formato NetCDF, usando el programa ACD/MS *Manager* en su versión de prueba [71] para poder ser procesados en el programa Mzmine 2.9 [72] con el fin de visualizar y manipular los cromatogramas, las corriente iónicas totales (TICs), el espectro ultravioleta y los espectros de masas de cada uno de los picos cromatográficos. Previo al tratamiento de los datos se eliminaron las señales que no corresponden a la muestra de acuerdo con el blanco de metanol, en este caso señales por debajo de los 1,5 min.

Se procesaron las TICs con el programa Mzmine en búsqueda de los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$ y aductos formados, siendo el ión $[M+CH_3CN]^+$ el aducto más frecuentemente encontrado. El programa generó una matriz con el tiempo de retención y la masa molecular de cada pico cromatográfico. Finalmente, se comparan las masas moleculares, el patrón de fragmentación y el espectro UV de los compuestos purificados que puedan estar presentes en cada uno de los extractos analizados.

2.3.4.2 Comparación de los extractos de los órganos de *O. caudata* por análisis multivariado.

El estudio fitoquímico comparativo entre las diferentes partes de la especie se llevó a cabo por HPLC-DAD y HPLC-MSESI.

Los datos obtenidos en el equipo HPLC-DAD-MSESI fueron convertidos al formato NetCDF, usando el programa ACD/MS *Manager* [71] para poder ser procesados en el programa Mzmine 2.9 [72] que permite realizar la detección de picos, corrección de línea base, deconvolución y alineación, los datos obtenidos se exportaron como archivos *.csv para ser procesados mediante el programa The Unscrambler X 10.3 en su versión de prueba [73]. Los datos alineados fueron escalados y normalizados para la realización del análisis estadístico multivariado (análisis de componentes principales – PCA y análisis de conglomerados jerárquico – HCA).

El análisis de componentes principales (PCA) se realizó usando el algoritmo *Non-linear Partial Least Squares* (NIPALS) sin rotación y para la parte gráfica se tuvieron en cuenta

las tres primeras componentes. Para el análisis de conglomerados jerárquico (HCA) se empleó el método de Ward y la distancia Euclídeana.

2.3.5 Extracción de los aceites esenciales de las hojas de *O. caudata*.

Las hojas frescas de *O. caudata* (345 g) se separaron, se cortaron y sometieron a destilación por arrastre de vapor durante 2 horas. Después de este periodo el aceite se secó sobre sulfato de sodio anhidro, obteniéndose un aceite de color amarillo pálido con un rendimiento del 0.37 % (m/m), el cual se almacenó entre 0-5 °C para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se preparó una disolución del aceite esencial (AE) para su análisis por GC-MS disolviendo 25,0 µL de AE en n-hexano hasta un volumen final de 1,0 mL. Se inyectó 1 µL de esta dilución en el cromatógrafo.

2.3.5.1 Análisis por GC-MS de los aceites esenciales de hojas de *O. caudata*.

El AE de hojas de *O. caudata* se analizó por GC-MS en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890AGC, con inyector *split/splitless* acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5973, modo de ionización IE, analizador de masas cuadrupolar y dos sistemas de separación. El primero empleó una columna apolar RTX-5MS (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) bajo las siguientes condiciones de operación: El gas de arrastre fue helio a un flujo de 1.0 mL/min. La temperatura del horno se programó desde 50 °C (2 min) hasta 160 °C (5 min) a 4 °C/min, luego se incrementó hasta 220 °C (5 min) a 2.5 °C/min y finalmente la temperatura aumentó a 280 °C (5 min) a 8 °C/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 250 °C y la de la línea de transferencia de 285 °C, la relación de *split* 1:20 y el voltaje de ionización fue de 70 eV a una corriente de 60 µA. La adquisición de los espectros de masas se realizó en un rango de masas entre 35-400 m/z. El segundo sistema de separación fue una columna polar HP-INNOWax (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) operado bajo las mismas condiciones excepto por la programación de la temperatura del horno que fue de la siguiente forma: 40 °C (5 min) hasta 250 °C (10 min) a 4 °C/min.

La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los índices de retención (IR) y sus espectros de masas con los reportados en las librerías NIST08, Wiley9L, Pherobase y en Adams [74]. Los IR se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de n-alcanos ($C_7 - C_{24}$), corridos bajo las mismas condiciones de análisis cromatográficas que el aceite esencial. La integración de la corriente iónica total, expresada en porcentaje de área, se utilizó como un parámetro aproximado para determinar la composición relativa del aceite [75].

2.3.6 Estudio de la fracción lipídica de los frutos de *O. caudata*.

Una porción de los frutos colectados se apartó para estudiar su contenido de ácidos grasos. Se retiró el cáliz de los frutos, obteniéndose 27,3 g de frutos secos y 1,4 g de cáliz. Posteriormente, los frutos y cáliz secos y molidos (por separado) se extrajeron con heptano mediante extracción sólido-líquido en un equipo soxhlet. Finalmente, se eliminó el disolvente por rotaevaporación a presión reducida para obtener 15 g de la fracción de ácidos grasos de frutos y 620 mg del cáliz. Este extracto se analizó por GC-MS y GC-FID, realizando la saponificación y posterior derivatización con BF_3 en metanol con el fin de obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos de la siguiente forma: A 50 mg del extracto de ácidos grasos se agregaron 5 mL de BF_3 en metanol al 14 % (Sigma-Aldrich), se dejó reaccionando a 85 °C durante una hora, al término de este tiempo se extrajeron los ésteres metílicos con 1 mL de heptano (3 veces), se secaron y se almacenaron entre 0-5 °C para ser analizados por GC-MS y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC-FID).

Con el fin de evaluar la calidad de la fracción lipídica de los frutos se hicieron ensayos del índice de acidez (titulación con NaOH 0,01 N) y el índice de yodo (método de Wijs) [77].

2.3.6.1 Análisis por GC-MS de la fracción lipídica de los frutos de *O. caudata*.

Los ésteres metílicos se analizaron por GC-MS en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890AGC, con inyector *split/splitless* acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5973, modo de ionización IE y analizador de masas

cuadrupolar. La columna utilizada fue HP-FFAP (50 m x 200 μm x 0.33 μm) bajo las siguientes condiciones de operación: gas de arrastre helio a un flujo de 1.0 mL/min. La temperatura del horno se programó desde 100 °C (0 min) hasta 240 °C (10 min) a 5 °C/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 250 °C y la de la línea de transferencia de 285 °C, la relación de *split* 1:30 y el voltaje de ionización fue de 70 eV a una corriente de 60 μA . La adquisición de los espectros de masas se realizó en un rango de masas entre 40 - 450 m/z.

La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los espectros de masas con los reportados en las librerías NIST08 y Wiley9L. La integración de la corriente iónica total, expresada en porcentaje de área, se utilizó como un parámetro aproximado para determinar la composición relativa del extracto de ácidos grasos [76,77].

2.3.6.2 Análisis por GC-FID de la fracción lipídica de los frutos de *O. caudata*.

Los ésteres metílicos también se analizaron por GC-FID en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014, equipado con un automuestreador AOC-20i+s, con inyector *split/splitless* acoplado a un detector de ionización por llama. La columna utilizada fue RT-2560 (100 m x 250 μm x 0.2 μm) bajo las siguientes condiciones de operación: gas de arrastre helio a un flujo de 1.2 mL/min. La temperatura del horno se programó desde 100 °C (3 min) hasta 240 °C (10 min) a 3 °C/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 225 °C y de la línea de transferencia de 240 °C y la relación de *split* 1:200.

Para la cuantificación e identificación de los ácidos grasos por GC-FID, se elaboró una curva de calibración a partir de un patrón de ácidos grasos metilados (*Food Industry FAMES Mix # 35077*, Restek, 30 mg/mL en CH_2Cl_2) y se corrieron los patrones bajo las mismas condiciones cromatográficas que la fracción lipídica.

En la Tabla 2-1 se relacionan los tiempos de retención (t_R) de cada uno de los ácidos grasos que se encuentran en el patrón de FAMES para la elaboración de las curvas de calibración, la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal (r).

Tabla 2-1. Datos obtenidos de las curvas de calibración para la cuantificación de ácidos grasos por GC-FID

t_R	Ácido graso		Ecuación de la curva	r
11,51	Ácido butírico	C4:0	$Y=1,11e-2X+29,21$	0,9944
13,60	Ácido caproico	C6:0	$Y=8,36e-3X+29,14$	0,9945
17,14	Ácido caprílico	C8:0	$Y=6,99e-3X+29,53$	0,9939
22,03	Ácido decanoico	C10:0	$Y=6,08e-3X+30,39$	0,9934
24,71	Ácido undecanoico	C11:0	$Y=6,12e-3X+13,76$	0,9933
27,41	Ácido dodecanoico	C12:0	$Y=5,81e-3X+29,92$	0,9942
30,07	Ácido tridecanoico	C13:0	$Y=5,31e-3X+24,13$	0,9951
32,64	Ácido mirístico	C14:0	$Y=5,78e-3X+29,22$	0,9942
34,74	Ácido miristoleico	C14:1	$Y=5,60e-3X+22,18$	0,9956
35,18	Ácido pentadecanoico	C15:0	$Y=5,57e-3X+22,93$	0,9960
37,76	Ácido pentadecenoico	C15:1	$Y=5,34e-3X+25,33$	0,9952
37,52	Ácido palmítico	C16:0	$Y=5,98e-3X+30,97$	0,9938
39,18	Ácido palmítoleico	C16:1	$Y=5,47e-3X+24,30$	0,9967
39,78	Ácido heptadecanoico	C17:0	$Y=5,97e-3X+22,04$	0,9958
41,41	Ácido heptadecenoico	C17:1	$Y=5,38e-3X+24,99$	0,9951
41,96	Ácido estearico	C18:0	$Y=6,28e-3X+30,00$	0,9945
42,94	Ácido eláídico	C18:1	$Y=6,04e-3X+16,13$	0,9910
43,36	Ácido oleico	C18:1	$Y=6,08e-3X+30,69$	0,9945
44,47	Ácido linoeláídico	C18:2	$Y=5,79e-3X+25,13$	0,9959
45,40	Ácido linoleico	C18:2	$Y=5,89e-3X+22,73$	0,9966
46,07	Ácido eicosanoico	C20:0	$Y=7,02e-3X+30,77$	0,9939
46,90	Ácido γ -Linolénico	C18:3	$Y=5,84e-3X+21,92$	0,9945
47,37	Ácido eicosenoico	C20:1	$Y=6,71e-3X+21,79$	0,9961
47,70	Ácido α -Linolénico	C18:3	$Y=6,20e-3X+21,51$	0,9938
48,00	Ácido heneicosanoico	C21:0	$Y=7,42e-3X+23,77$	0,9942
49,25	Ácido eicosadienoico	C20:2	$Y=6,44e-3X+24,89$	0,9961
49,87	Ácido behénico	C22:0	$Y=8,29e-3X+32,44$	0,9938
50,70	Ácido eicosatrienoico	C20:3	$Y=6,59e-3X+22,94$	0,9957
51,10	Ácido erúico	C22:1	$Y=7,54e-3X+26,11$	0,9977
51,45	Ácido 5,8,11-eicosatrienoico	C20:3	$Y=6,60e-3X+22,97$	0,9981
51,68	Ácido araquidónico	C20:4	$Y=8,18e-3X+28,68$	1,0000
51,81	Ácido tricosanoico	C23:0	$Y=3,19e-3X+39,09$	0,9974
52,99	Ácido docosadienoico	C22:2	$Y=7,50e-3X+26,27$	0,9974
53,55	Ácido lignocérico	C24:0	$Y=1,05e-2X+32,25$	0,9929
54,20	Ácido eicosapentaenoico	C20:5	$Y=6,37e-3X+27,03$	0,9952
54,88	Ácido nervónico	C24:1	$Y=9,69e-3X+22,85$	0,9952
60,00	Ácido docosahexaenoico	C22:6	$Y=8,28e-3X+27,35$	0,9945

La identificación de los compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención de los componentes de la fracción lipídica con los tiempos de retención del patrón de FAMES, y la cuantificación de cada uno de los ácidos grasos interpolando las áreas de cada uno de los picos del cromatograma de la fracción lipídica en la ecuación de la curva de calibración.

2.3.6.3 Uso de la fracción lipídica en la elaboración de una emulsión.

En la elaboración de emulsiones es importante la selección de los agentes emulsionantes [63], en este caso la composición de la fracción contiene principalmente ácidos grasos, los cuales son considerados emolientes liposolubles que le proporcionan suavidad y sensación de bienestar a la piel [78]. No obstante, además de lo anterior es necesario asegurarse que la fracción no sea tóxica y que su olor y estabilidad química son compatibles con los demás ingredientes de la emulsión. En este aspecto, desafortunadamente debido a que la cantidad de fracción lipídica obtenida (15 g) no es alta y a que la disponibilidad de obtener más frutos de la planta se limita al mes de abril de cada año no fue posible realizarle pruebas de toxicidad y estabilidad a la fracción. Sin embargo, se conoce que varios ácidos grasos (entre ellos los que contiene la fracción lipídica) son considerados ingredientes seguros e inertes y son empleados en formulaciones de algunos productos como los cosméticos en los que se utilizan como emolientes, agentes espesantes y cuando se mezclan con glicerina como agentes de limpieza [78,79]. Teniendo en cuenta esta información se propuso continuar con la elaboración de la emulsión con posibles usos vía tópica, de esta manera se busca dar un mayor valor agregado a una especie vegetal que en la región donde se realizó la colecta de la planta se usa tradicionalmente como cerca viva.

Las emulsiones son formas farmacéuticas que están constituidas por dos fases, una lipofílica y otra hidrofílica. Estas preparaciones pueden ser líquidas o semisólidas y su producción se basa en la formación de una emulsión generalmente aceite en agua, su consistencia depende de las proporciones de aceite o agua y en este sentido se clasifican como fase aceite en agua (O/W, del inglés *oil-in-water*) en la que la fase externa es lipofílica y fase agua en aceite (W/O, del inglés *water-in-oil*) en la que la fase externa es acuosa [80].

Para la preparación de la emulsión se fundieron 75 g la base O/W (Acofarma S.A.) de color blanco y la fracción lipídica por separado a 37 °C. Luego se incorporó la fracción lipídica (10 % m/m) a la base agitando continuamente para finalmente agregar 25 g de agua a la misma temperatura con agitación continua hasta enfriamiento.

La base O/W utilizada es una base no-iónica por lo que el uso de ácidos grasos permitiría obtener un mayor equilibrio hidrófilo-lipófilo requerido en el emulsionante, aumentar la estabilidad y cohesividad de la película de interfase y mejorar la consistencia y textura del producto [63]. La composición de la base es la siguiente, % m/m:

Glicerina 10 – 25 %

Miristato de *isopropilo* 10 – 25 %

Parafina 10 – 25 %

Alcohol estearílico 10 – 25 %

Polímeros de etilenglicol 10 – 25 %

Hexanoato de cetearilo 10 – 25 %

Cera de abeja 1 – 5 %

Polidimetilsiloxano 1 – 5 %

Aceite vegetal hidrogenado 1 – 5 %

Estearato de estearilo 1 – 5 %

Ácido esteárico 0,1 – 1 %

pH 6,5 – 7,5

La base empieza a fundir a baja temperatura (entre 35 – 38 °C).

La escasa cantidad de fracción lipídica disponible condujo a obtener muy poca emulsión que no alcanzó para realizar unas buenas prácticas según el modelo de calidad basado en el diseño (QbD), que permitiera seguir los protocolos propios de desarrollo de un producto desde la materia prima, la pre- y formulación para un posterior escalamiento del producto. Por tal motivo, en este trabajo el alcance se limita a una primera aproximación en saber si es posible incorporar los ácidos grasos a una base emulsificante sin pretender demostrar su funcionalidad.

Como un primer acercamiento hacia el conocimiento de las características de la emulsión elaborada, se efectuaron las siguientes pruebas de control de calidad de acuerdo con la farmacopea de los Estados Unidos (USP 30):

- Características organolépticas:

Las características sensoriales evaluadas en la emulsión fueron la homogeneidad, textura, consistencia, color y olor. Para ésta prueba se tomaron 25 g de la emulsión en

un vaso de precipitados de 50 mL para ser probados por un panel sensorial de doce personas conformado por ocho mujeres y dos hombres. El olor se determinó introduciendo una tira de papel de filtro en la emulsión y los panelistas perciben el olor comparándolo con alguna característica conocida. El color se determina transfiriendo la emulsión a un tubo de ensayo hasta llenar las tres cuartas partes del mismo, se observó el color, turbidez y separación de fases. La presencia de grumos y untuosidad de la emulsión se evaluó tomando una pequeña de la muestra con los dedos y se aplica en el dorso de la mano apreciando la existencia o no de grumos y grasa.

- Determinación del pH

Se preparó una mezcla al 10 % m/v de la emulsión en agua destilada y se determina su pH en un potenciómetro previamente calibrado.

- Determinación de extensibilidad de la emulsión

Se pesaron 0,2 g de emulsión que se presionó entre dos superficies de vidrio, se agrega un peso de 100 g durante 1 min y se mide el área que ocupa la emulsión después de adicionar el peso.

- Determinación de la viscosidad de la emulsión

La viscosidad relaciona el comportamiento reológico de la emulsión, para éste propósito se tomó una pequeña cantidad de muestra y se introdujo en el viscosímetro Brookfield DVII.

- Determinación de la termorresistencia de la emulsión

Para la determinación de la termorresistencia se evalúan las propiedades físicas y organolépticas descritas anteriormente a dos temperaturas, una la temperatura ambiente y la otra a 37 °C, durante uno y dos meses.

- Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se llevó a cabo para la determinación de mesófilos totales por el método de conteo de aerobios mesófilos totales en placa y coliformes totales mediante el método de recuento por dilución en tubo: NMP.

2.3.7 Síntesis de alcaloides fenantrénicos a partir de boldina (Oc-23)

Los productos naturales presentan una diversidad química compleja, lo cual los hace interesantes para la síntesis o semisíntesis de nuevos productos con diferentes usos. Newman y Cragg [81] hicieron una revisión desde 1981 hasta 2010 sobre la importancia de los productos naturales como fuente de nuevas estructuras ya sean usados directamente como medicamento o como prototipo para nuevos medicamentos. En este sentido, en la Figura 2-3 se observa la participación de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos contribuyendo con cerca del 50 % de los nuevos medicamentos aprobados hasta diciembre de 2010, de éstos el 22 % son productos de semisíntesis y el 14 % emplearon un producto natural como modelo para su síntesis, corroborando la necesidad de que grupos de investigación en síntesis orgánica continúen con la modificación de los núcleos de productos naturales activos para obtener nuevos medicamentos [81].

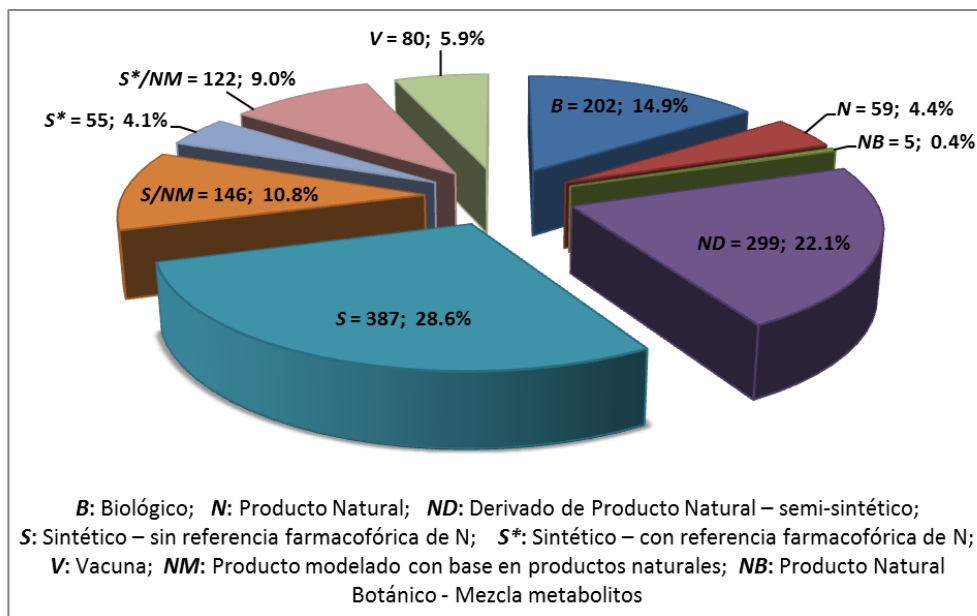


Figura 2-3. Participación de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos desde 1981 a 2010 [80].

Los alcaloides aporfínicos presentan un esqueleto tetracíclico con diferentes sustituyentes, este modelo se ha asociado con un amplio rango de actividades

biológicas como agente dopaminérgico, actividades anti-plaquetarias, propiedades antioxidantes, citotóxicas y antibacterianas, por lo que varios estudios se han enfocado en el potencial de los alcaloides aporfínicos en el desarrollo de fármacos [82].

Udvardy y colaboradores [83] analizaron la relación estructura-actividad (SAR) de estructuras de alcaloides aporfínicos y su farmacología concluyendo que se deben tener en cuenta dos principales hechos estructurales: a) La saturación de los anillos B y C (ver Figura 3-2, numeral 3.1.1, página 49), por ejemplo comparación entre los alcaloides aporfínicos y los oxoaporfínicos o dehidroaporfínicos y b) El patrón de sustitución del núcleo aporfínico, es decir los *N*-sustituyentes, la presencia de fenoles y los sustituyentes poco comunes de cadenas largas o aromáticas por ejemplo. Otro factor a tener en cuenta cuando se desea explicar los mecanismos de acción de los compuestos es la diferencia en la conformación de los esqueletos aporfínicos ya que los oxoaporfínicos y dehidroaporfínicos son moléculas planas mientras que los aporfínicos como tal tienen una conformación tipo bifenilo torcido que requiere un mayor espacio de interacción. En cuanto a la densidad de carga, es de anotar que los alcaloides oxoaporfínicos tienen una región cargada negativamente en las proximidades de la función amino, mientras que los aporfínicos propiamente dichos no presentan una región definida pues depende de los sustituyentes en los anillos A y D siendo los fenoles los más activos por su facilidad para hacer puentes de hidrógeno. Finalmente, concluyen que los derivados *N*-metilo de oxoaporfinas (amonio cuaternario) mejoran la actividad antibacteriana, mientras que los derivados aporfínicos *N*-formilo, *N*-acetilo y *N*-metoxicarbonilos reducen la actividad antimicrobiana [83].

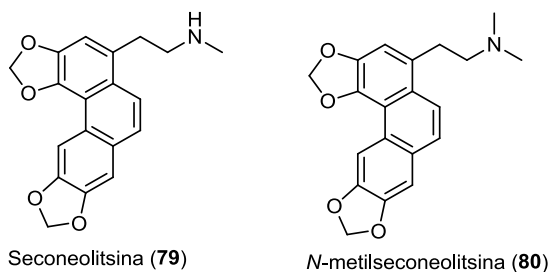
2.3.7.1 Algunos trabajos que implican modificaciones estructurales de la Boldina

La boldina (**Oc-23**) es un alcaloide aporfínico que se encuentra ampliamente distribuido en algunas familias de plantas, siendo más abundante en *Peumus boldus* (Monimiaceae) tradicionalmente conocida como boldo. En la familia Lauraceae se ha aislado de *Ocotea puberula*, *Litsea angustifolia*, *Litsea aggregata*, *Litsea glutinosa*, *Litsea wightiana*, *Litsea lancifolia*, *Neolitsea sericea*, *Phoebe grandis*, *Actinodaphne pruinosa*, *Actinodaphne nítida*, *Beilschmiedia kunstleri*, *Sassafras albidum* y *Laurus*

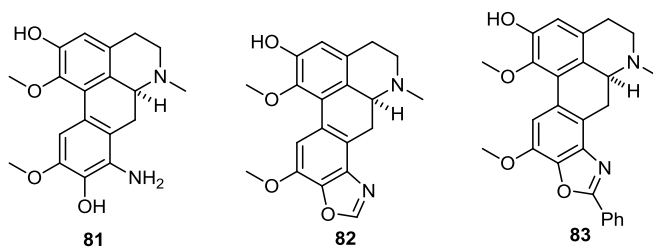
nobilis. La boldina ha exhibido propiedades hepatoprotectoras, actividad antioxidante, citotoxicidad, efecto antiinflamatorio y actividad antinociceptiva [84]. La boldina presenta un grupo fenol en el anillo A y otro en el D capaces de hacer puentes de hidrógeno y un $N\text{-CH}_3$, por lo tanto teniendo en cuenta lo expuesto por Udvardy y colaboradores [83], es deseable realizar modificaciones en el anillo B sobre el grupo amina con el fin de mejorar la potencialidad de su actividad biológica. Esta transformación en los grupos funcionales puede resultar con o sin degradación de su esqueleto, formando nuevas estructuras y compuestos que son difíciles y algunas veces imposibles de ser obtenidos a través de la síntesis química convencional.

En la literatura se encuentran diversas actividades biológicas asociadas a la boldina, entre estos trabajos se destacan algunos que además de evidenciar el efecto de la boldina muestran el efecto de derivados y análogos con el objetivo de elaborar un perfil de relación estructura-actividad (SAR) para los modelos estudiados.

García y colaboradores [85], sintetizaron a partir de la boldina 18 alcaloides (7 de tipo aporfínico y 11 de tipo fenantrénico) evaluando su actividad contra *Streptococcus pneumonia*, principal causante de la neumonía. De los 18 alcaloides, únicamente dos de tipo fenantreno (**79** y **80**) presentaron efectividad en la acción.



Zhang y colaboradores [86] presentan tres alcaloides derivados de la boldina con efectos dopaminérgicos que incluyen 8-aminoboldina (**81**) y dos oxazoloboldinas (**82** y **83**).



2.3.7.2 Modificaciones químicas de la boldina:

El panorama expuesto anteriormente permitió seleccionar a la boldina (**Oc-23**) como compuesto de partida para su modificación. Otro factor por el que se eligió la boldina fue la posibilidad de conseguirla comercialmente (Sigma-Aldrich) o como patrón autentico resultado de otras investigaciones fitoquímicas, con el fin de contar con cantidad suficiente para ajustar las condiciones de la síntesis. En este sentido, la obtención de los derivados de la boldina (**S-1**, **S-2**, **S-3** y **S-3**) se llevó a cabo realizando algunas adaptaciones de los experimentos descritos en la literatura por Liu y colaboradores [87] y Lee y colaboradores [88], de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se disolvió la boldina **Oc-23** (0,035 M) en acetona, se agregó K_2CO_3 (0,070 M) y KI (0,001 M), esta mezcla se mantuvo en un baño de hielo y con agitación para posteriormente agregar el bromuro de alquilo (R-Br; 0,070 M). La mezcla se agitó constantemente sobre el baño de hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente, aproximadamente tres horas. Transcurrido este tiempo se agregó agua, luego se hizo una extracción con acetato de etilo, se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía *flash* (CF) empleando como eluyente mezclas de CH_2Cl_2 :MeOH.

La síntesis de los derivados fenantrénicos de la boldina se describe en la Figura 2-4, procedimiento adaptado de Liu y colaboradores [87] y Lee y colaboradores [88].

2.3.8 Actividad antibacteriana del aceite esencial y los compuestos aislados de las hojas de *O. caudata* y de los compuestos sintetizados.

Una constante inquietud para los países en vía de desarrollo como Colombia, es la alta tasa de mortalidad debida a la resistencia de los microorganismos patógenos a productos que contrarresten una amplia variedad de infecciones. Se considera, por ejemplo, que en las infecciones nosocomiales la mayoría de las bacterias causantes de la enfermedad son resistentes a al menos uno de los antibióticos más utilizados para tratarlas [89].

De otra parte, teniendo en cuenta que una buena cantidad de los medicamentos que se comercializan en los países occidentales se basan en productos naturales, y que la mayoría de los habitantes de las naciones emergentes utilizan las plantas como medio para aliviar sus requerimientos de salud, es importante promover este tipo de investigaciones hacia el mayor conocimiento de las plantas, en cuanto a sus componentes y validar sus propiedades farmacológicas para beneficio futuro de los pueblos. En este sentido, el interés por la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos a partir de diversas fuentes se ha venido incrementando debido al aumento de la resistencia de los microorganismos a los medicamentos empleados tal como se mencionó anteriormente [89]. Por lo tanto, diversos tipos de estudios se han llevado a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia, que incluyen la investigación de plantas con potenciales farmacológicos y terapéuticos, buscando aislar y caracterizar los metabolitos secundarios bioactivos de Lauráceas en Colombia, debido al hecho que muchas de las plantas pertenecientes a esta familia son ricas en metabolitos secundarios, la mayoría de ellos bioactivos. El aceite esencial, los metabolitos aislados y compuestos modificados se sometieron a ensayos *in vitro* de actividad antibacteriana con el fin de encontrar una nueva fuente de antibacterianos.

Existe una variedad de metodologías para evaluar o detectar la actividad, *in vitro*, antimicrobiana de un extracto o un compuesto puro. Los métodos más conocidos son los de difusión, autobiografía y dilución. No obstante, se prefieren aquellos métodos que

resulten asequibles, más económicos y reproducibles (dependiendo del compuesto a evaluar). En este sentido los métodos de difusión, ya sea en pozo o sensidiscos, son más ampliamente utilizados porque cumplen con las condiciones expuestas anteriormente y pueden ser comparables con otras investigaciones. El método de difusión en pozo tiene mejor sensibilidad respecto del método de difusión en sensidiscos, cuando se aplica a los productos naturales [90].

Para el ensayo de actividad antibacteriana se realizó un cultivo masivo a partir de un cultivo aislado de los microorganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus* ATCC (del inglés *American Type Culture Collection*) 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6638, y como bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Estas cepas fueron escogidas por ser microorganismos patógenos humanos y son referenciadas por el CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) en la revisión anual de la sensibilidad de antibióticos comerciales [91,92].

Un inóculo de cada microorganismo se suspendió en 10 ml de caldo Muller Hinton hasta alcanzar una concentración de 0,5 en la escala de McFarlan, luego se tomaron 100 µL de esta suspensión bacteriana y se adicionaron a 20 ml de agar Mueller Hinton líquido. Posteriormente, se inocularon las cajas Petri, que contenían agar Mueller Hinton, con cada cepa. Después de la solidificación del agar se hicieron pozos de 6 mm sobre el agar utilizando el reverso de una pipeta Pasteur previamente esterilizada para tal propósito. Finalmente se aplicaron en los pozos 30 µL de los tratamientos en concentraciones de 5, 10 y 20 mg/mL para el aceite esencial y de 2, 1 y 0,5 mg/mL para los compuestos **Oc-7** – **Oc-26** y **S-1** – **S-4**. Estas cajas se incubaron durante 24 horas a 37 °C bajo condiciones aeróbicas, cada prueba se realizó por triplicado. Se utilizaron como controles positivos Vancomicina (150 µg/mL) y Gentamicina (50 µg/mL), como control negativo se utilizó dimetilsulfoxido (DMSO) por ser este el disolvente en el cual se disolvieron las fracciones. Después del tiempo de incubación se realizó la lectura de cada una de las cajas de Petri y se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados por la actividad antimicrobiana de las muestras. Los halos de inhibición se expresaron en mm y son el resultado de la lectura del promedio de tres réplicas del ensayo.

3. Resultados y Discusión

3.1 Estudio fitoquímico de las hojas de *O. caudata*

La discusión sobre la determinación estructural de las sustancias obtenidas se realiza independientemente del orden de obtención de las mismas, a partir del fraccionamiento de las hojas de *Ocotea caudata*.

El estudio fitoquímico de las hojas de *O. caudata*, permitió el aislamiento y purificación de β -sitosterol (**Oc-5**), 1-triacontanol (**Oc-6**), *p*-hidroxifenilacetato de etilo (**Oc-7**), éster metílico del ácido cóstico (**Oc-8**), ácido cóstico (**Oc-9**), 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona (**Oc-10**), ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**), quercetina (**Oc-12**), afzelina (**Oc-13**), astragalina (**Oc-14**), isoquercitrina (**Oc-15**), thalictuberina (**Oc-16**), 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**), (+)-3-hidroxi*nomuciferina* (**Oc-18**), (+)-3-metoxi*nordomesticina* (**Oc-19**), (+)-*nordomesticina* (**Oc-20**), S-(+)-9-O-demetil*norpreocoteina* (**Oc-21**), (+)-*isoboldina* (**Oc-22**), (+)-*boldina* (**Oc-23**), (+)-*reticulina* (**Oc-24**), (+)-*palidina* (**Oc-25**), (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**), una mezcla de ácido palmítico (**Oc-1**) y ácido linoleico (**Oc-2**) y una mezcla de esteroides: campesterol (**Oc-3**), stigmasterol (**Oc-4**) y β -sitosterol (**Oc-5**). Los metabolitos encontrados se describen por primera vez para la especie, siendo este trabajo el primer estudio de la composición química de *O. caudata*. La (+)-3-hidroxi*nomuciferina* (**Oc-18**), la S-(+)-9-O-demetil*norpreocoteina* (**Oc-21**), el *p*-hidroxifenilacetato de etilo (**Oc-7**), el ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**) y la 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona (**Oc-10**), son reportados por primera vez en la familia Lauraceae, mientras que el éster metílico del ácido cóstico (**Oc-8**), el ácido cóstico (**Oc-9**) y el (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**) se reportan por primera vez para el género. Es de destacar la S-(+)-9-O-demetil*norpreocoteina* un

alcaloide sin antecedentes de reportes en la literatura, pero que se encuentra estrechamente relacionada con los alcaloides aislados previamente en especies del genero *Ocotea*. En la Figura 3-1 se presentan las estructuras de los compuestos aislados e identificados en las hojas de *O. caudata*.

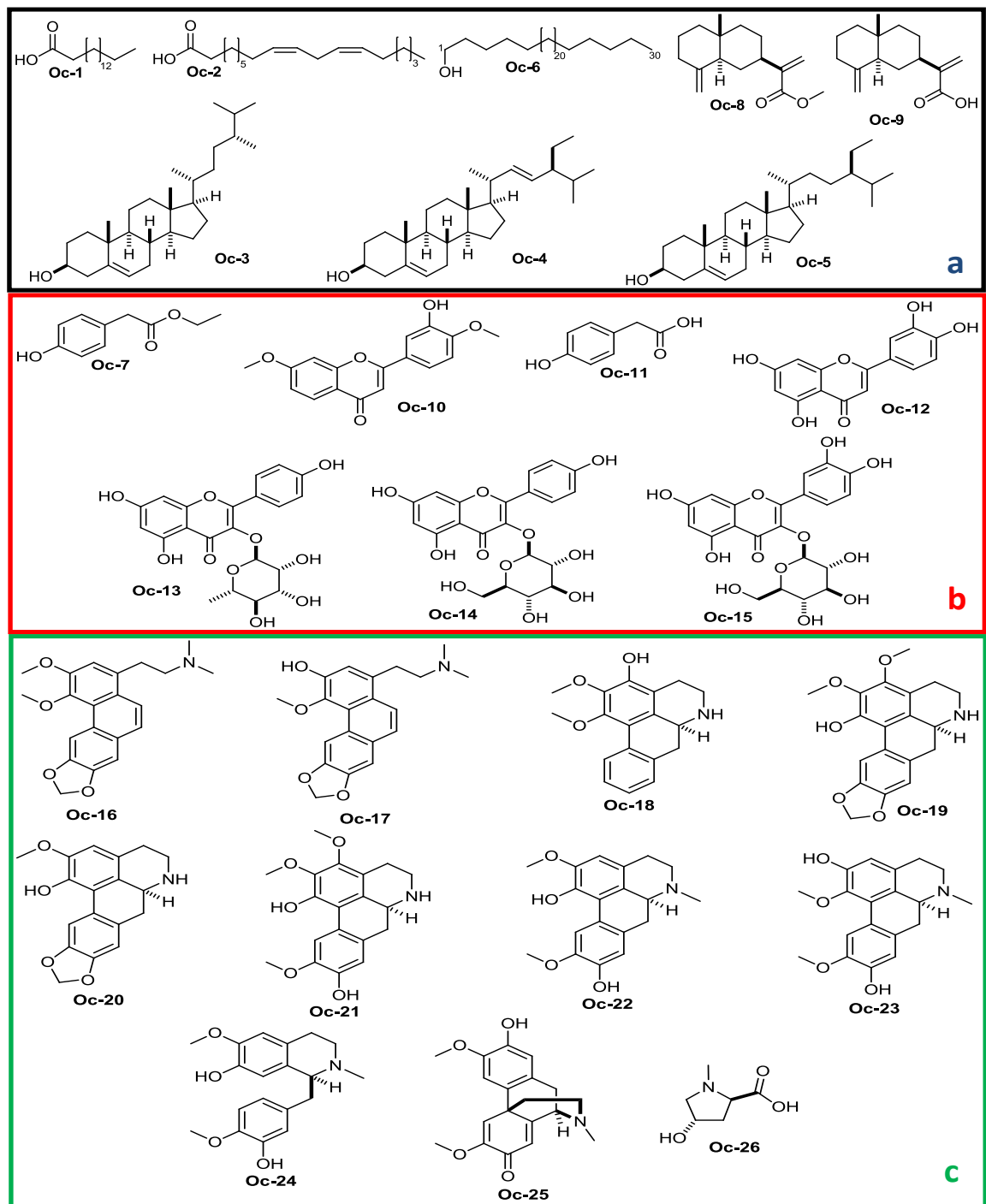


Figura 3-1. Metabolitos aislados de las hojas de *Ocotea caudata* agrupados por a. terpenos, esteroides, ácidos y alcohol grasos; b. fenoles y flavonoides y c. alcaloides

De acuerdo con la búsqueda en la literatura sobre el género *Ocotea* y la familia Lauraceae, se halló que los metabolitos de tipo esteroidal (**Oc-3** – **Oc-5**) y sesquiterpénico del tipo eudesmano (**Oc-8** y **Oc-9**) han sido ampliamente reportados en la familia Lauraceae y en el género *Ocotea* [59, 93].

En cuanto a los flavonoides obtenidos (**Oc-12** – **Oc-15**), es posible afirmar que los cuatro han sido reportados previamente en diferentes especies de la familia Lauraceae, corroborando la existencia de flavonoles derivados del kaempferol y quercetina en el género [52, 94]. La flavona **Oc-10** no ha sido aislada en Lauráceas pero si en Myristicaceae, una familia filogenéticamente cercana.

Los fenoles simples (C_6C_2) como los encontrados (**Oc-7** y **Oc-11**) son ácidos fenilacéticos naturales que biosintéticamente provienen de la L-fenilalina [95]. En este aspecto, es importante recalcar que los alcaloides benciltetrahidroisoquinolinícos naturales como la reticulina (**Oc-24**) que contienen en el anillo C una función oxigenada en posición *para*; pueden provenir biogenéticamente del ácido *p*-hidroxifenilacético explicando esta clase de sustituciones (*p*-hidroxi) en sus esqueletos. Además, es necesario recordar que la S-reticulina (**Oc-24**) es el precursor de la mayoría de alcaloides aporfínicos, entre ellos los reportados en especies de *Ocotea* [96, 97].

Los alcaloides (**Oc-16** – **Oc-25**) han sido aislados de otras especies de Lauráceas, a excepción de la (+)-3-hidroxinomuciferina (**Oc-18**), la (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**) y la S-(+)-9-*O*-demetilnorpreocoteina (**Oc-21**). La búsqueda en la literatura mostró que de 34 especies de *Ocotea* que han sido químicamente investigadas, los principales metabolitos secundarios obtenidos fueron alcaloides aporfínicos en un 53 %, alcaloides morfínicos 6 %, neolignanós 35 % y terpenos 9 %, lo cual evidencia que los alcaloides aporfínicos y los neolignanós caracterizan a las especies de este género [47]. Custódio y da Veiga [84], reportaron la presencia de 55 alcaloides aporfínicos en 18 especies de *Ocotea*. También Zanin y Lordello [51], describieron 54 alcaloides aporfínicos distribuidos en 17 especies de *Ocotea*, destacando que en especies que acumulan neolignanós no se detectó la presencia de alcaloides. Esta observación es importante desde el punto de vista quimiotaxonómico de las *Ocoteas* porque permitiría

clasificarlas químicamente en dos grupos; aquellas que acumulan neolignanos y no alcaloides y las que acumulan alcaloides pero no lignanos. En el caso de *O. caudata* no se detectó la presencia de neolignanos pero si alcaloides, permitiendo ubicar esta planta dentro de las especies de *Ocotea* en las que predominan los alcaloides.

Todos los compuestos aislados fueron elucidados por métodos espectroscópicos (RMN 1D y 2D, EM) y su rotación específica, por comparación con los datos descritos en la literatura.

A continuación se presentan las características espectroscópicas que condujeron a la elucidación estructural de los compuestos obtenidos, haciendo una descripción detallada de la elucidación de **Oc-21** debido a que es un compuesto sin reportes previos en la literatura.

3.1.1 Elucidación estructural de alcaloides isoquinolínicos.

Los alcaloides más frecuentemente encontrados en el género *Ocotea* son los de núcleo aporfínico (ver Figura 3-2). En el presente estudio de *O. caudata* se aislaron diez alcaloides isoquinolínicos, principalmente con esqueleto aporfínico. En este sentido, se presentan algunos aspectos generales de los alcaloides aporfínicos relacionados con la elucidación estructural de esta clase de compuestos.

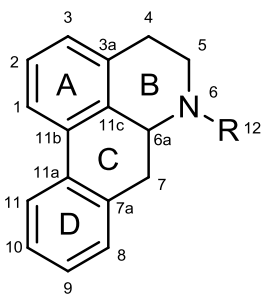


Figura 3-2. Núcleo básico de los alcaloides aporfínicos

Los alcaloides aporfínicos son biosintetizados a partir de los alcaloides benciltetrahidro/isoquinilínicos mediante acoplamientos oxidativos, originando un patrón de sustitución para su esqueleto bencilisoquinolínico [96 – 99].

Una constante encontrada en estos núcleos es que en el anillo A siempre se presenta oxigenación en los carbonos 1 y 2, y en algunas ocasiones puede haber también sustitución en el carbono 3, mientras que en el anillo D las sustituciones se encuentran frecuentemente en los carbonos 9, 10 y 11 (siendo más común en los carbonos 9 y 10 para los aislados de la familia Lauraceae) y muy escasas las sustituciones en el carbono 8 [98, 100 – 103].

En cuanto al análisis estructural de los alcaloides aporfínicos, estos compuestos se caracterizan por presentar en RMN ^1H desplazamientos químicos característicos entre δ_{H} 6,50 – 8,50 debido a los hidrógenos de los anillos aromáticos y entre δ_{H} 3,40 – 4,00 correspondiente a los metoxilos, teniendo en cuenta que los que se ubican en el carbono 1 se encuentran más protegidos, se les asigna el desplazamiento hacia campo más alto (entre δ_{H} 3,40 – 3,70). Para los hidrógenos aromáticos, la señal correspondiente al hidrógeno en el carbono 3 se presenta como un singlete con desplazamientos químicos entre δ_{H} 6,40 – 6,70 y para el hidrógeno en el carbono 11 depende de la presencia de los sustituyentes en los carbonos 1 y 10, pero generalmente se encuentra entre δ_{H} 7,50 – 8,20. Los hidrógenos en los carbonos 8, 9 y 10 habitualmente presentan desplazamientos entre δ_{H} 6,70 – 7,40; mientras que los hidrógenos alifáticos de los carbonos 4, 5 y 7 son multipletes con desplazamientos entre δ_{H} 2,00 – 4,00 [98, 100 – 103].

En cuanto a los hidrógenos del grupo bencenodioxol (metilendioxo), si el grupo se encuentra en el anillo A entre los carbonos 1 y 2, normalmente se presenta un doblete ($J = 1,5 \text{ Hz}$) y su desplazamiento será entre δ_{H} 5,9 – 6,10, mientras que los que se encuentran en el anillo D entre los carbonos 9 y 10 la señal generalmente es un singlete con desplazamiento hacia δ_{H} 5,90. Finalmente, el metilo unido al grupo $N\text{-CH}_3$, se presenta como un singlete entre δ_{H} 2,40 - 2,50 [98, 100 – 103].

El análisis de los espectros de RMN ^{13}C para los alcaloides aporfínicos presentará las siguientes características:

El carbono 4 exhibirá desplazamientos químicos entre δ_{C} 28,0 – 30,0, mientras que para los carbonos 5, 6a y 7 hacia δ_{C} 53,0; 62,0 y 34,0, respectivamente. No obstante para los

alcaloides *nor*aporfínicos la ausencia del metilo unido al nitrógeno produce en los carbonos 5 y 6a protección y las señales se observan hacia δ_C 43,0 y 53,0 respectivamente, mientras que el carbono 7 sufre desprotección y la señal se observa hacia δ_C 37,0 [100 – 105].

Los carbonos no oxigenados de los anillos A y D tendrán señales entre δ_C 105,0 – 115,0; mientras que los carbonos oxigenados entre δ_C 155,0 – 130,0. Los carbonos de los grupos metoxilo se observan entre δ_C 59,0 - 61,0 o entre δ_C 55,0 - 56,0. El carbono del grupo bencenodioxol ya sea que se encuentre en el anillo A o D presentará un desplazamiento químico hacia δ_C 100,0 y el carbono del metilo unido al nitrógeno entre δ_C 40,0 – 43,0 [100 – 105].

3.1.1.1 Elucidación estructural de *S-(+)-9-O-demetilnorpreocoteina (Oc-21)*.

El alcaloide **Oc-21** se aisló como un sólido café con punto de fusión de 144 °C. UV λ_{max} nm (CHCl₃): 315, 303, 275, 228 indicando la presencia de un sistema altamente conjugado y que corresponde a núcleos aporfínicos [98]. La rotación óptica determinada fue $[\alpha]_D^{20} +66.2^\circ$ (*c* 0.05, CHCl₃), según Cavé y colaboradores [99] en los alcaloides aporfínicos esta propiedad física determina la configuración absoluta del centro estereogénico del carbono 6a, de manera que los compuestos dextrógiros tienen configuración *S* y los levógiros *R*, para el caso del compuesto **Oc-21** el valor de la rotación óptica obtenido determinó que la configuración del carbono 6a es *S*. La configuración absoluta de C-6a se confirmó como *S* por el espectro de dicroísmo circular (DC), el cual mostró un efecto Cotton negativo en 213 nm y un efecto Cotton positivo en 235 nm (ver Figura 3-3). Ringdahl y colaboradores [106], examinaron 19 curvas de DC de 19 alcaloides aporfínicos de origen natural observando que para los núcleos aporfínicos disustituídos en el anillo D, la configuración *R* presenta una absorción positiva hacia los 216 nm y negativa para la configuración *S* [106, 107].

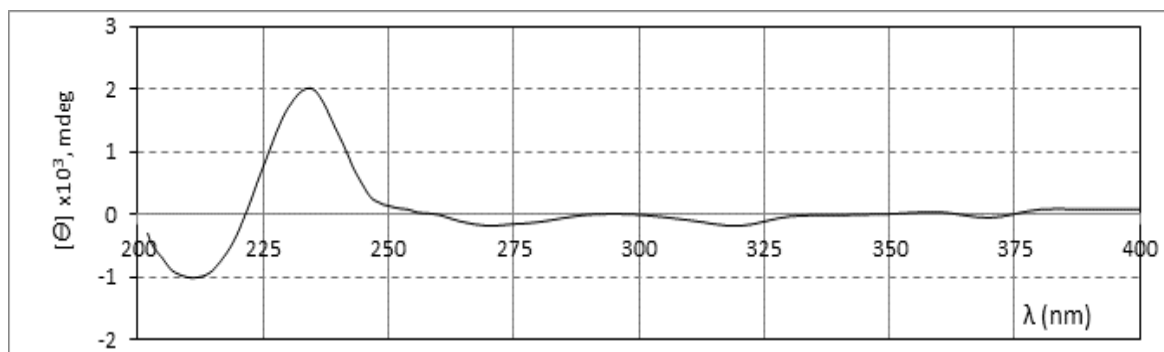


Figura 3-3. Espectro de dicroísmo circular de **Oc-21**.

El análisis por HRMS-ESI mostró el ión molecular a m/z 344.1489 (ver Figura 3-4) para el ión *pseudomolecular* $[M+H]^+$ (calculado para $C_{19}H_{22}NO_5$ en 344.1497).

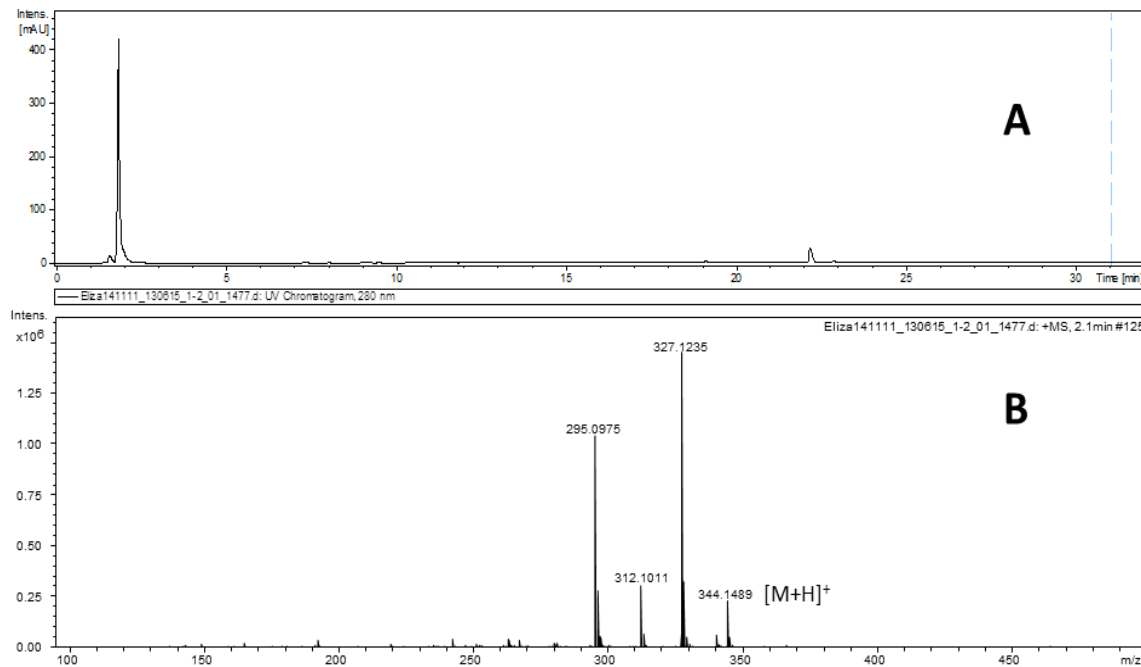


Figura 3-4. Perfil cromatográfico a 280 nm y espectro de masas de **Oc-21**. **A.** Cromatograma HPLC a 280 nm, columna Luna C18 de 150 x 2.0 mm, 3 μ m. **B.** Espectro de masas HRMS-ESI modo positivo.

El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas confirma la estructura propuesta para el compuesto **Oc-21** (ver Figura 3-5)

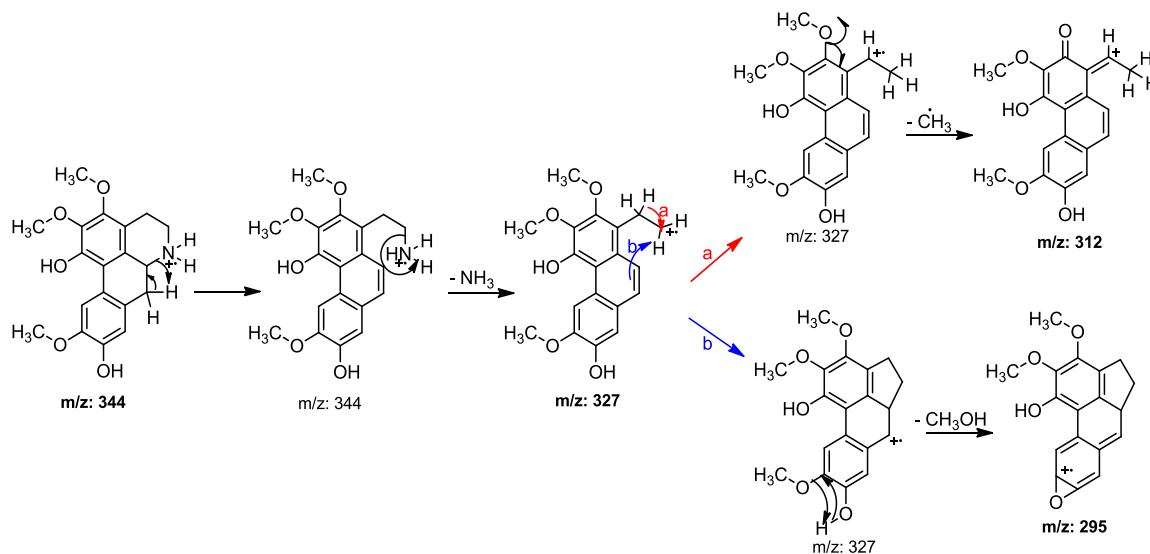


Figura 3-5. Fragmentaciones observadas para el compuesto **Oc-21** [108].

El espectro de RMN ^1H (ver Figura 3-6, Tabla 3-1) presentó dos señales singletes, que integran cada una para un hidrógeno, en la región de los hidrógenos aromáticos en δ_{H} 6,67 y 7,94, correspondientes a los protones sobre el carbono 8 y 11 respectivamente. En δ_{H} 3,92, 3,84 y 3,83 se observan tres singletes que integran cada uno para tres hidrógenos relacionados con tres metoxilos unidos a anillo aromático. No obstante no se aprecia el singlete entre δ_{H} 2,40 - 2,50 que integre para tres hidrógenos por lo que se considera que es un alcaloide *noraporfínico* [98].

El espectro de RMN ^{13}C APT (ver Figura 3-7, Tabla 3-1) permitió observar 19 señales correspondientes a 19 carbonos; tres metilenos, tres metinos, tres metilos y 10 cuaternarios. La conectividad entre los hidrógenos y sus respectivos carbonos fue establecida por medio del experimento HSQC (ver Figura 3-8), tres carbonos metilénicos en δ_{C} 23,1; 42,7 y 35,9; tres carbonos metínicos, dos de ellos unidos a anillo aromático en δ_{C} 111,4 y 114,4 y tres metoxilos unidos a anillo aromático en δ_{C} 56,0; 60,0 y 60,9 [104 – 105].

Tabla 3-1. Datos de RMN ^1H y ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **Oc-21**.

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J(Hz)]
1	144,6	
2	139,1	
3	148,4	
3a	118,4	
4	23,1	2,79 – 2,73 (m, 2H)
5	42,7	3,42 (dt, $J = 13,9$; 3,5, 1H, Ha) 2,93 – 2,86 (m, 1H, Hb)
6a	53,9	3,78 (d, $J = 4,5$, 1H)
7	35,9	2,68 – 2,61 (m, 2H, Ha, Hb)
7a	128,4	
8	114,4	6,67 (s, 1H)
9	144,6	
10	145,5	
11	111,4	7,94 (s, 1H)
11a	124,0	
11b	116,0	
11c	130,8	
2-OCH ₃	60,9	3,92 (s, 3H)
3-OCH ₃	60,0	3,83 (s, 3H)
10-OCH ₃	56,0	3,84 (s, 3H)

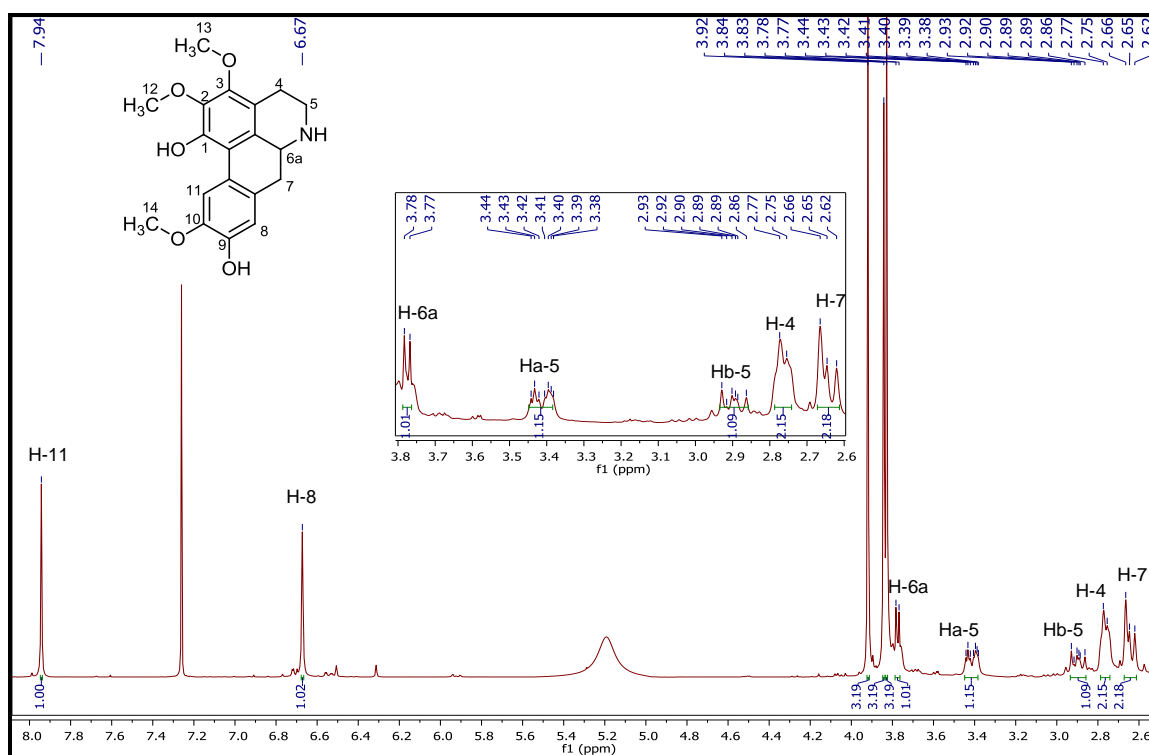


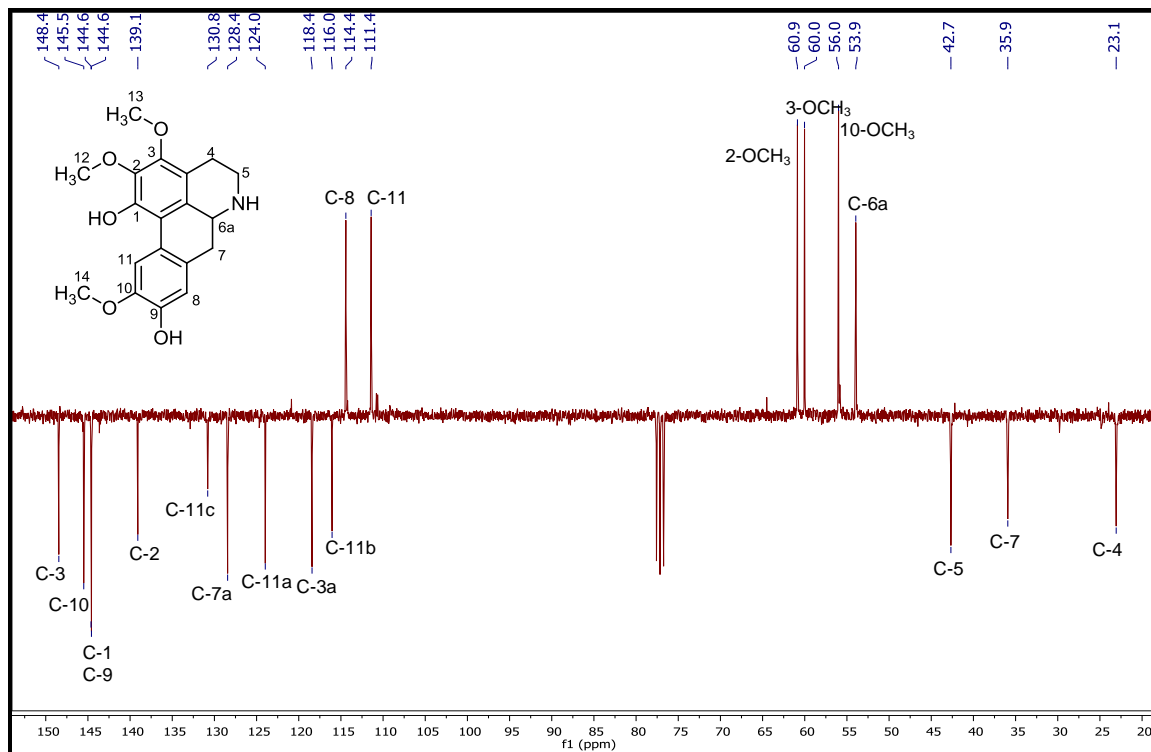
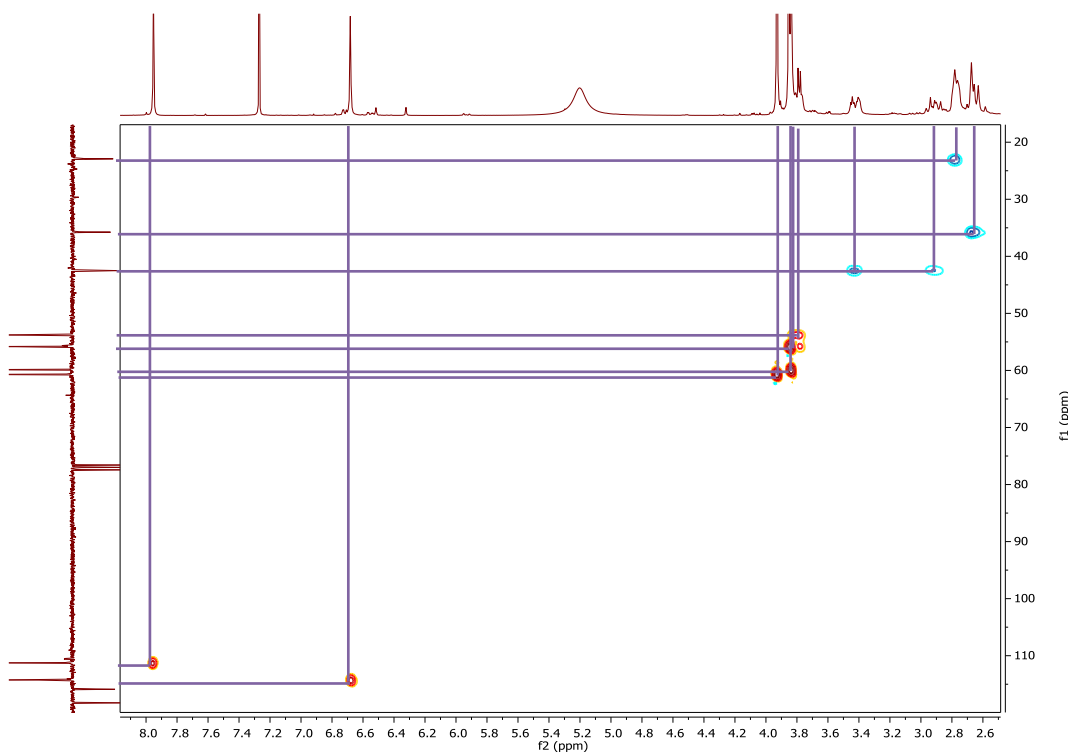
Figura 3-6. Espectro RMN ^1H de **Oc-21** (300 MHz, CDCl_3).**Figura 3-7.** Espectro de RMN ^{13}C APT de **Oc-21** (75 MHz, CDCl_3)

Figura 3-8. Espectro HSQC de **Oc-21** (300/75 MHz, CDCl₃).

En el espectro COSY ¹H-¹H (ver Figura 3-9) se confirma el acoplamiento vecinal entre el hidrógeno en δ_H 3,42 (dt, $J = 13,9$; 3,5, 1H, Ha) y los hidrógenos en δ_H 2,79 – 2,73 (m, 2H) ubicados en los C-5 y C-4 respectivamente y entre el hidrógeno en δ_H 3,78 (d, $J = 4,5$, 1H) y los hidrógenos en δ_H 2,68 – 2,61 (m, 2H, Ha, Hb) de los C-6a y C-7. También se observa el acoplamiento geminal entre los hidrógenos del C-5 en δ_H 3,42 (dt, $J = 13,9$; 3,5, 1H, Ha) y δ_H 2,93 – 2,86 (m, 1H, H-5b).

En el espectro HMBC (ver Figura 3-10, Tabla 3-2), se observan correlaciones a larga distancia entre el hidrógeno del carbono 8 (δ_H 6,67) y el carbono 7 (δ_C 35,9) y entre el hidrógeno del carbono 11 (δ_H 7,94) y el carbono 11b (δ_C 116,0), como también correlaciones de los hidrógenos de los metoxilos en δ_H 3,83 (δ_C 60,0); 3,84 (δ_C 56,0) y 3,92 (δ_C 60,9) con los carbonos 3, 10 y 2 respectivamente en δ_C 148,4; 145,5 y 139,1. Para poder ubicar los metoxilos en los carbonos 2, 3 y 10 se observaron las siguientes correlaciones: El hidrógeno en δ_H 7,94 (δ_C 111,4 C-11) y el hidrógeno en δ_H 6,67 (δ_C 114,4, C-8) con el carbono δ_C 145,5 (C-10); el hidrógeno en δ_H 2,79 – 2,73 (δ_C 23,1, C-4) con el carbono δ_C 148,4 (C-3). Las correlaciones en el espectro NOESY (ver Figura 3-11) entre el hidrógeno en δ_H 7,94 (δ_C 111,4, C-11) y δ_H 3,84 (3H, s, 10-OCH₃); entre los hidrógenos metoxilos en δ_H 3,83 (δ_C 60,0, 3-OCH₃) y δ_H 2,79 – 2,73 (m, 2H, H-4) y entre el hidrógeno en δ_H 6,67 (δ_C 114,4, C-8) y δ_H 2,68 – 2,61 (m, 2H, H-7) confirmaron la ubicación de los metoxilos.

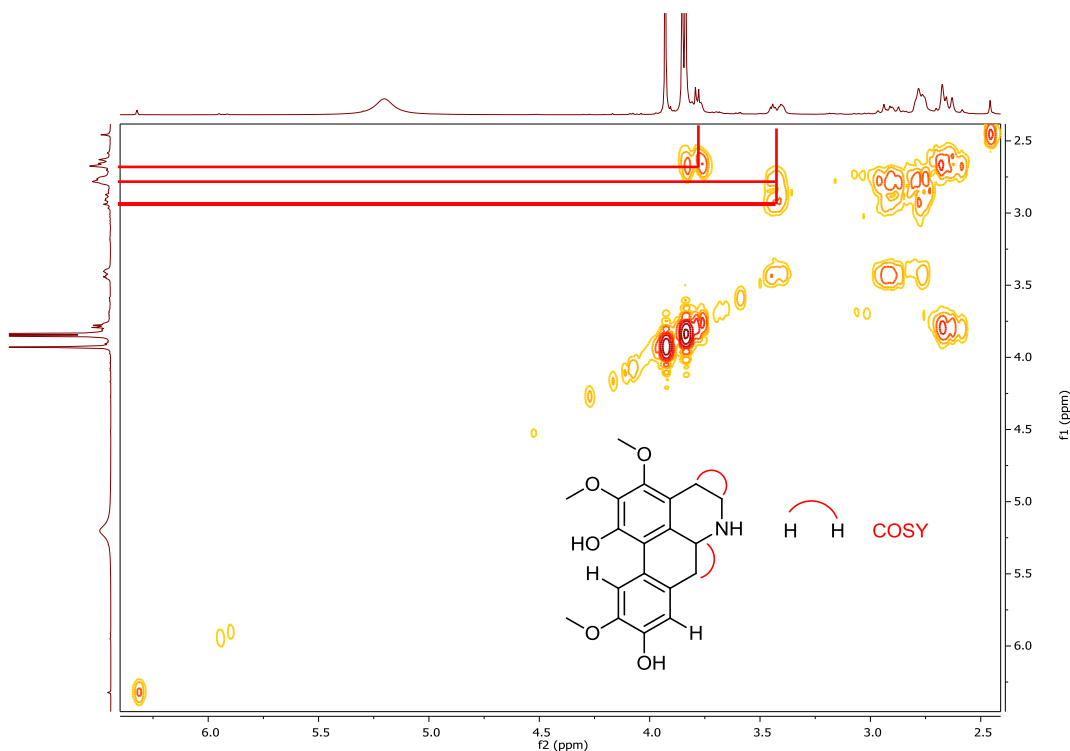


Figura 3-9. Espectro COSY ^1H - ^1H de **Oc-21** (300 MHz, CDCl_3).

Tabla 3-2. Correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC de **Oc-21** (300/75 MHz, CDCl_3)

C/H	HSQC		HMBC (H \rightarrow C)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m)	
1	144,6		
2	139,1		
3	148,4		
3a	118,4		
4	23,1	2,79 – 2,73 (m, 2H)	C-3, C-3a, C-5, C-11c
5	42,7	3,42 (dt, $J = 13,9$; 3,5, 1H, Ha) 2,93 – 2,86 (m, 1H, Hb)	C-6a, C-3a
6a	53,9	3,78 (d, $J = 4,5$, 1H)	C-1, C-11c, C-7
7	35,9	2,68 – 2,61 (m, 2H, Ha, Hb)	C-11c, C-8, C-6a
7a	128,4		
8	114,4	6,67 (s, 1H)	C-10, C-11a, C-7
9	144,6		
10	145,5		
11	111,4	7,94 (s, 1H)	C-10, C-7a, C11b
11a	124,0		
11b	116,0		
11c	130,8		
2-OCH ₃	60,9	3,92 (s, 3H)	C-2
3-OCH ₃	60,0	3,83 (s, 3H)	C-3
10-OCH ₃	56,0	3,84 (s, 3H)	C-10

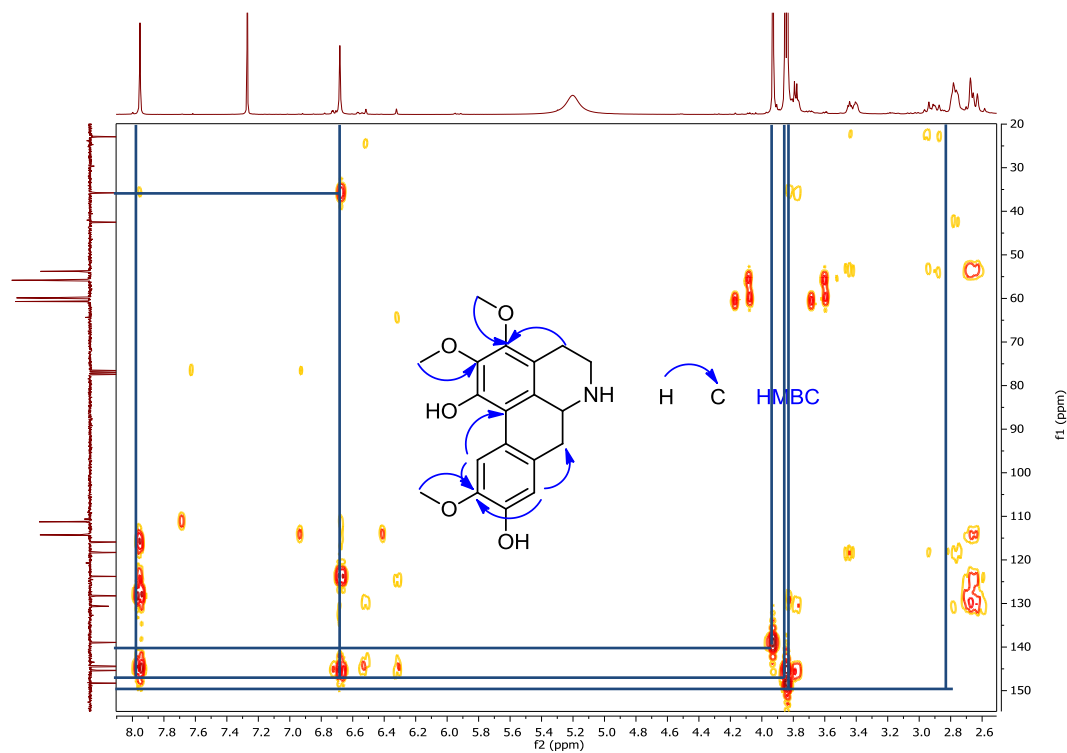


Figura 3-10. Espectro HMBC de **Oc-21** (300/75 MHz, CDCl_3).

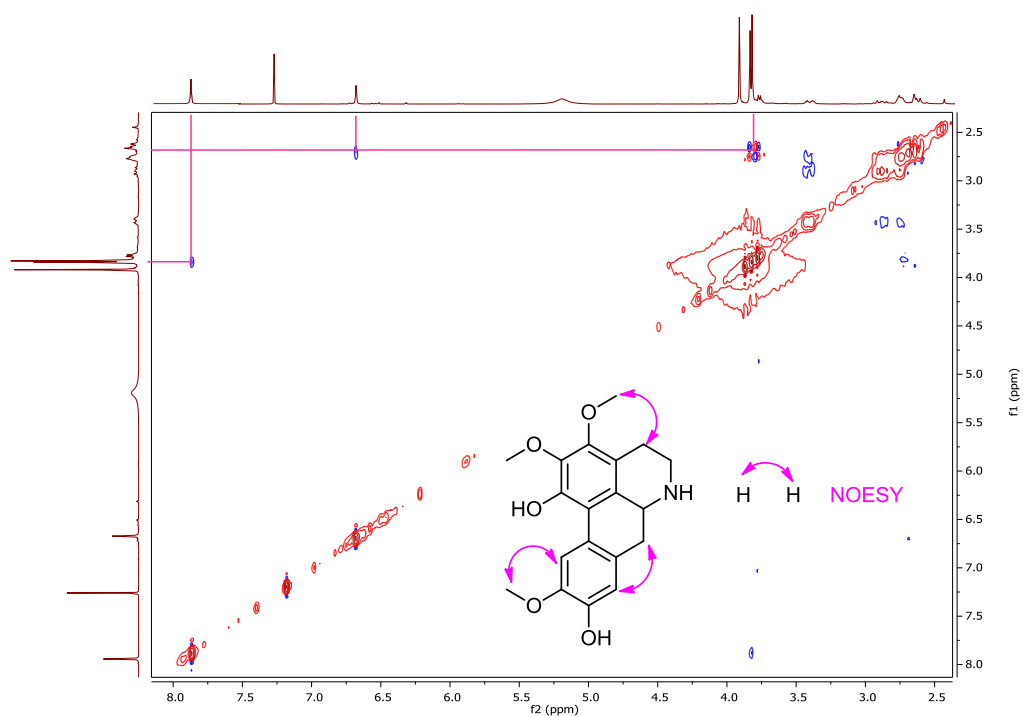


Figura 3-11. Espectro NOESY de **Oc-21** (300 MHz, CDCl_3).

Finalmente, el análisis estructural permitió establecer la estructura mostrada en la Figura 3-12. Este compuesto presenta una estructura típica de los alcaloides aporfínicos aislados en especies del género *Ocotea*, con patrones de sustitución en los carbonos 1, 2, 9, 10 usuales en éstos núcleos, no presenta reportes previos en la literatura, por lo que se considera nuevo y se determinó como (S)-2,3,10-trimetoxi-5,6,6a,7-tetrahidro-4*H*-dibenzo[*de,g*]quinolina-1,9-diol, denominado (S)-(+)-9-*O*-demetilnorpreocoteina.

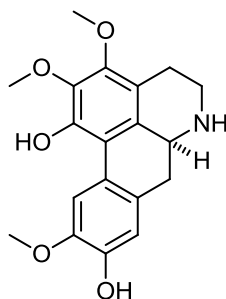
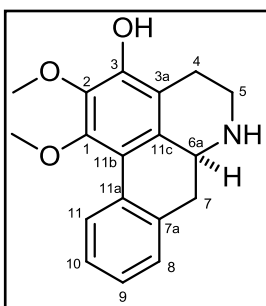


Figura 3-12. Estructura de **Oc-21**

3.1.2 Datos espectroscópicos de los alcaloides conocidos aislados de hojas de *O. caudata*.



(+)-3-hidroxinomuciferina (Oc-18). Sólido amarillo. Punto de fusión 195 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +190.2 ° (c 0.09, CHCl₃). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H 2,77 – 2,80 (m, 2H, H-4), 3,43 (dt, 1H, *J* = 12,3, 4,3; Ha-5), 2,90 – 3,01(m, 1H, Hb-5), 3,81 (dd, 1H, *J* = 13,7, 4,8; H-6a), 2,83 (dd, 1H, *J* = 13,8, 4,8; Heq-7), 2,73 (d, 1H, *J* = 13,8, Hax-7), 7,21 – 7,25 (m, 1H, H-8), 7,14 – 7,20 (m, 1H, H-9), 7,28 (ddd, 1H, *J* = 7,0, 1,8; 0,9; H-10), 8,21 (dd, 1H, *J* = 7,8, 0,9; H-11), 3,73 (s, 3H, 1-OCH₃), 3,98 (s, 3H, 2-OCH₃). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C 149,1 (C-1), 138,9 (C-2), 146,4 (C-3), 118,4 (C-3a), 23,4 (C-4), 42,7 (C-5), 53,9 (6a), 37,2 (C-7), 135,2 (C-7a), 127,7 (C-8), 126,4 (C-9), 126,9 (C-10), 127,3 (C-11), 132,3 (C-11a), 116,1 (C-11b), 132,8 (C-11c), 60,3 (1-OCH₃), 61,1 (2-OCH₃). EM [IE, 70 eV] *m/z* (%): 297 (79), 296 (100), 280 (31), 282 (27), 152 (23). $[M]^+$ *m/z* 297 corresponde a la fórmula molecular C₁₈H₁₉NO₃ [109-110].

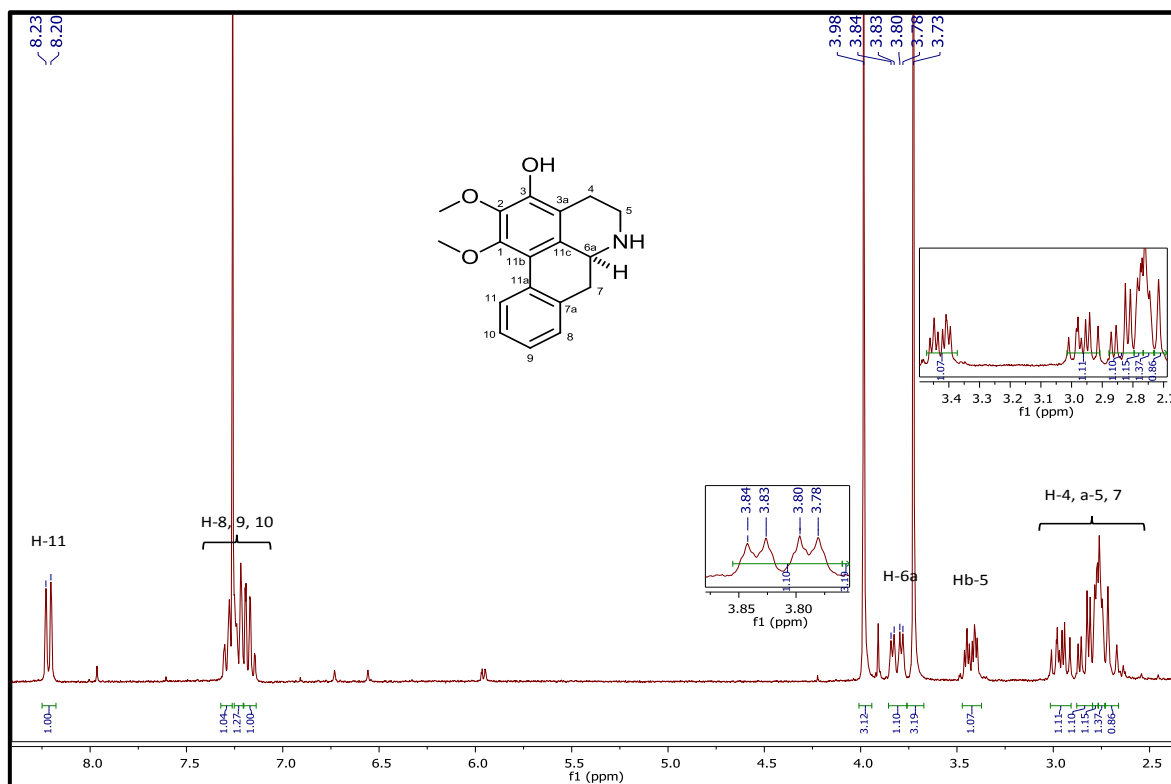


Figura 3-13. Espectro RMN ^1H de (+)-3-hidroxinomiciferina (Oc-18) (300 MHz, CDCl_3).

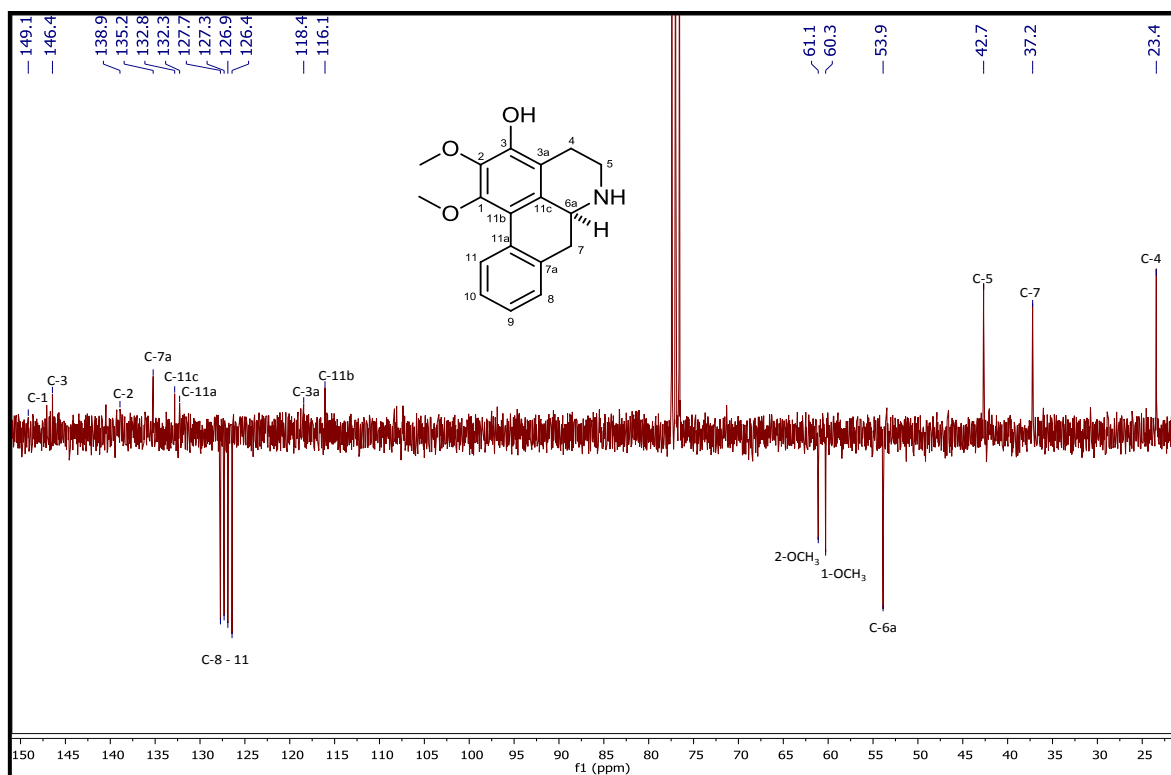
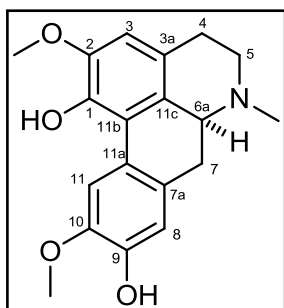
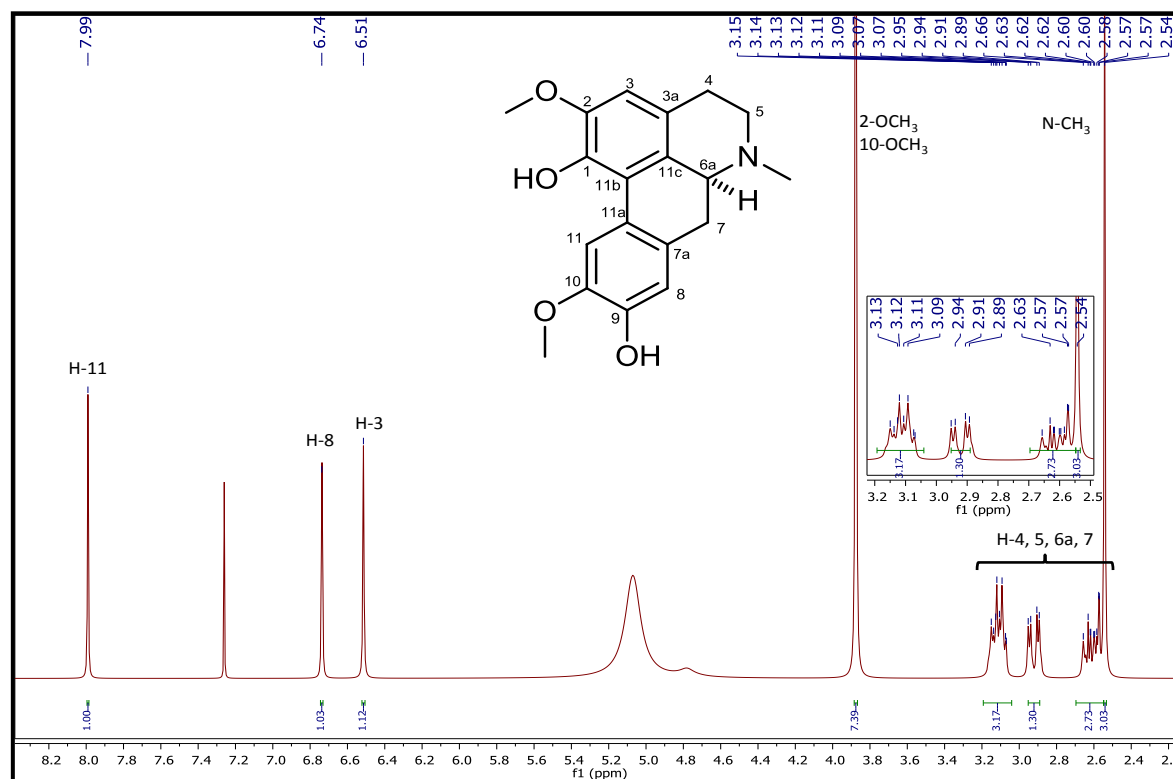
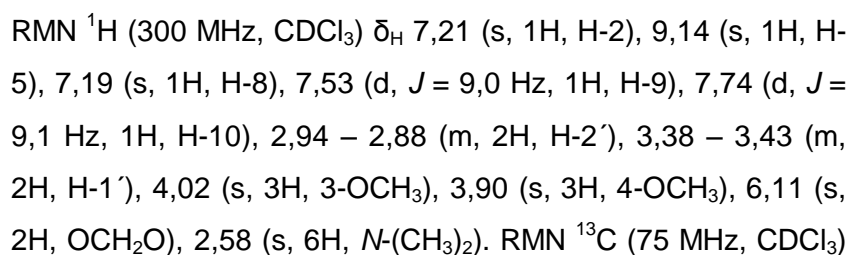
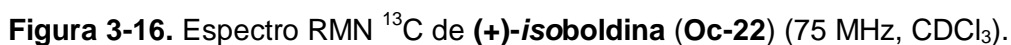


Figura 3-14. Espectro RMN ^{13}C de **(+)-3-hidroxinomuciferina (Oc-18)** (75 MHz, CDCl_3).

(+)-isoboldina (Oc-22). Sólido amarillo pálido. Punto de fusión $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+41.4\text{ }^{\circ}$ ($c\ 0.07$, CHCl_3). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3,13 – 3,10 (m, 1H, Ha-4), 2,67 – 2,61 (m, 1H, Hb-4), 3,10 – 3,06 (m, 1H, Ha-5), 2,56 – 2,54 (m, 1H, Hb-5), 3,16 – 3,13 (m, 1H, H-6a), 2,92 (dd, $J = 13.9$; 4,1 Hz, 1H, Heq-7), 2,60 – 2,57 (m, 1H, Hax-7), 6,51 (s, 1H, H-3), 6,74 (s, 1H, H-8), 7,99 (s, 1H, H-11), 3,88 (s, 6H, 2-OCH₃, 10-OCH₃), 2,54 (s, 3H, N-CH₃).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 140,7 (C-1), 146,0 (C-2), 108,7 (C-3), 123,8 (C-3a), 28,6 (C-4), 53,3 (C-5), 62,5 (6a), 33,9 (C-7), 129,4 (C-7a), 114,2 (C-8), 144,7 (C-9), 145,3 (C-10), 111,8 (C-11), 124,1 (C-11a), 119,8 (C-11b), 126,7 (C-11c), 56,1 (2-OCH₃), 56,2 (10-OCH₃), 43,6 (N-CH₃). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 327 (83), 326(100), 312 (27), 284 (36), 253 (26). $[\text{M}]^+$ m/z 327 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$. [103, 111, 112]

**Figura 3-15.** Espectro RMN ^1H de **(+)-isoboldina (Oc-22)** (300 MHz, CDCl_3).



δ_c 129,5 (C-1), 114,8 (C-2), 150,6 (C-3), 145,8 (C-4), 121,5 (C-4a), 106,6 (C-5), 133,6 (5a), 147,9 (C-6), 147,5 (C-7), 105,5 (C-8), 125,3 (C-8a), 129,1 (C-9), 120,6 (C-10), 124,0 (C-10a), 60,3 (C-1'), 31,4 (C-2'), 56,9 (3-OCH₃), 60,0 (4-OCH₃), 101,3 (OCH₂O), 44,6 (*N*-(CH₃)₂). HRMS-ESI [M+H]⁺ *m/z* 354.1700 (calculado para C₂₁H₂₄NO₄ en 354.1705) [113].

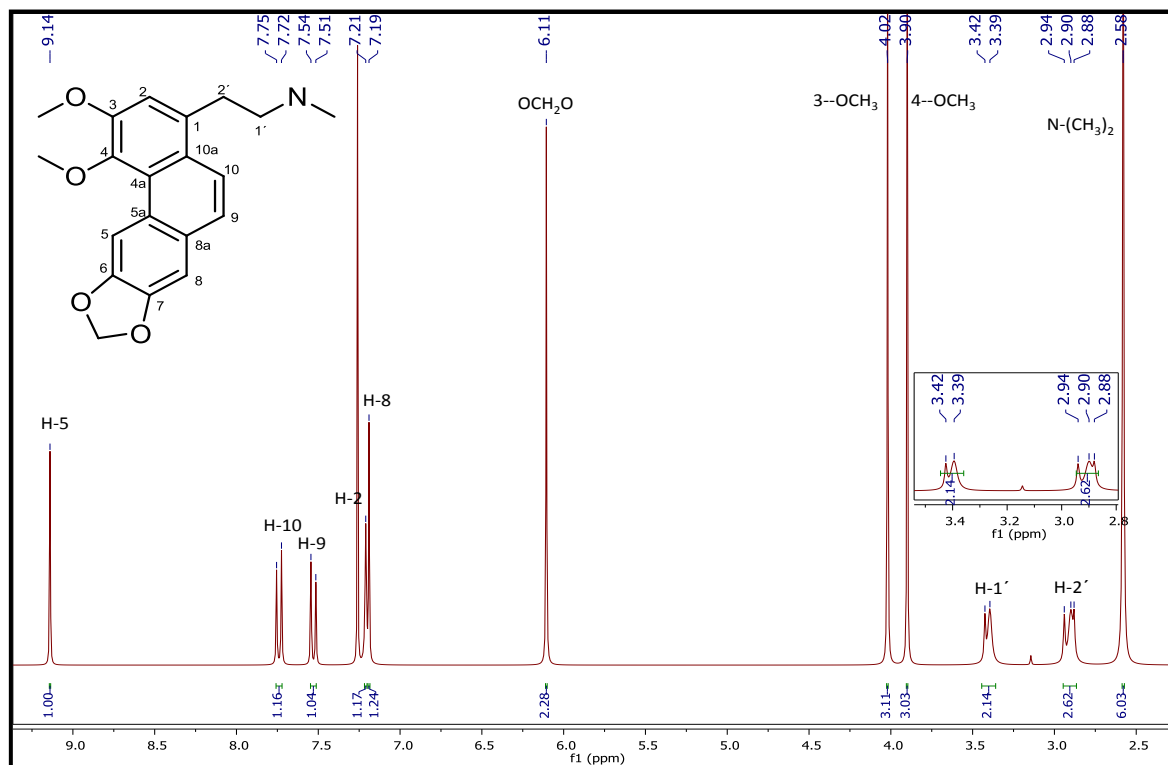


Figura 3-17. Espectro RMN ^1H de Thalictuberina (Oc-16) (300 MHz, CDCl_3).

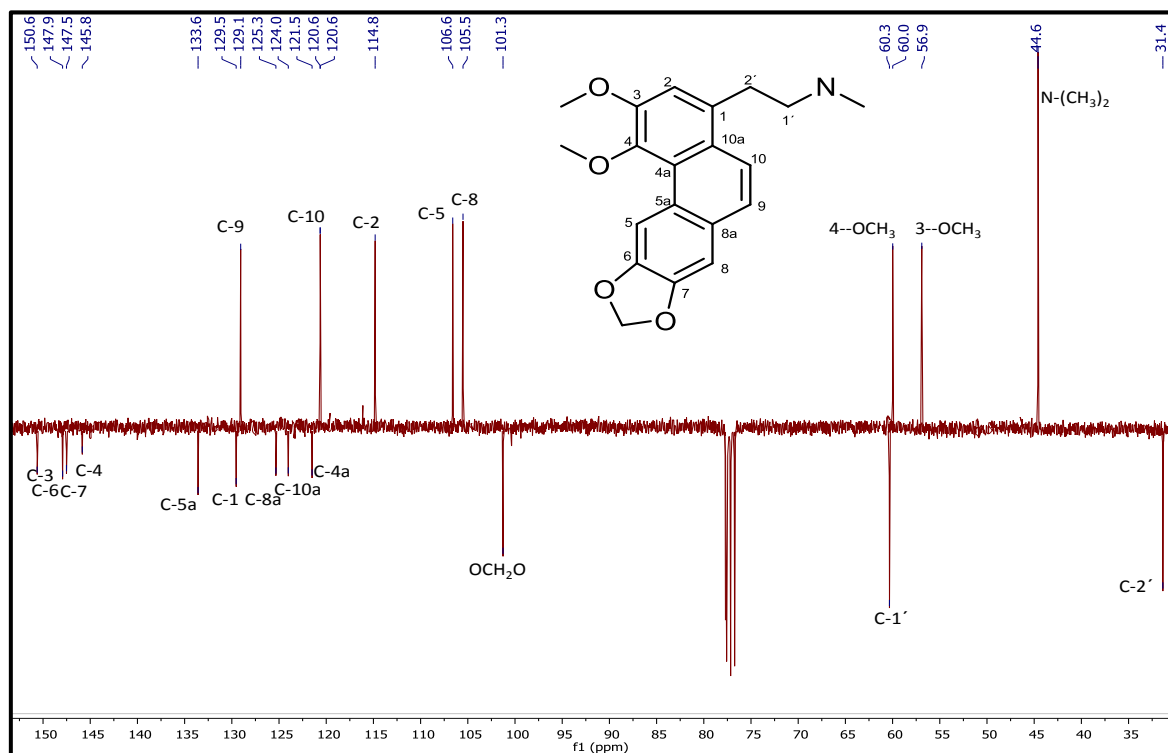
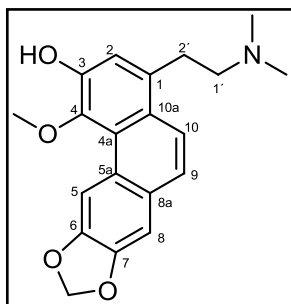


Figura 3-18. Espectro RMN ^{13}C de Thalictuberina (Oc-16) (75 MHz, CDCl_3).



3-O-demetilthalictuberina (Oc-17). Agujas beige. Punto de fusión 183 °C. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7,15 (s, 1H, H-2), 8,91 (s, 1H, H-5), 7,09 (s, 1H, H-8), 7,45 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-9), 7,70 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-10), 3,18 – 3,12 (m, 2H, H-1'), 2,64 – 2,59 (m, 2H, H-2'), 3,78 (s, 3H, 4-OCH₃), 6,06 (s, 2H, OCH₂O), 2,34 (s, 6H, $N(\text{CH}_3)_2$). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 129,5 (C-1), 117,4 (C-2), 147,7 (C-3), 142,2 (C-4), 124,6 (C-4a), 105,6 (C-5), 133,6 (5a), 147,4 (C-6), 147,1 (C-7), 105,3 (C-8), 125,3 (C-8a), 124,6 (C-9), 121,0 (C-10), 125,0 (C-10a), 60,6 (C-1'), 31,6 (C-2'), 59,9 (4-OCH₃), 101,3 (OCH₂O), 45,2 ($N(\text{CH}_3)_2$). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 339 (8), 238 (4), 152 (5), 59 (4), 58 (100). $[\text{M}]^+$ m/z 339 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ [113].

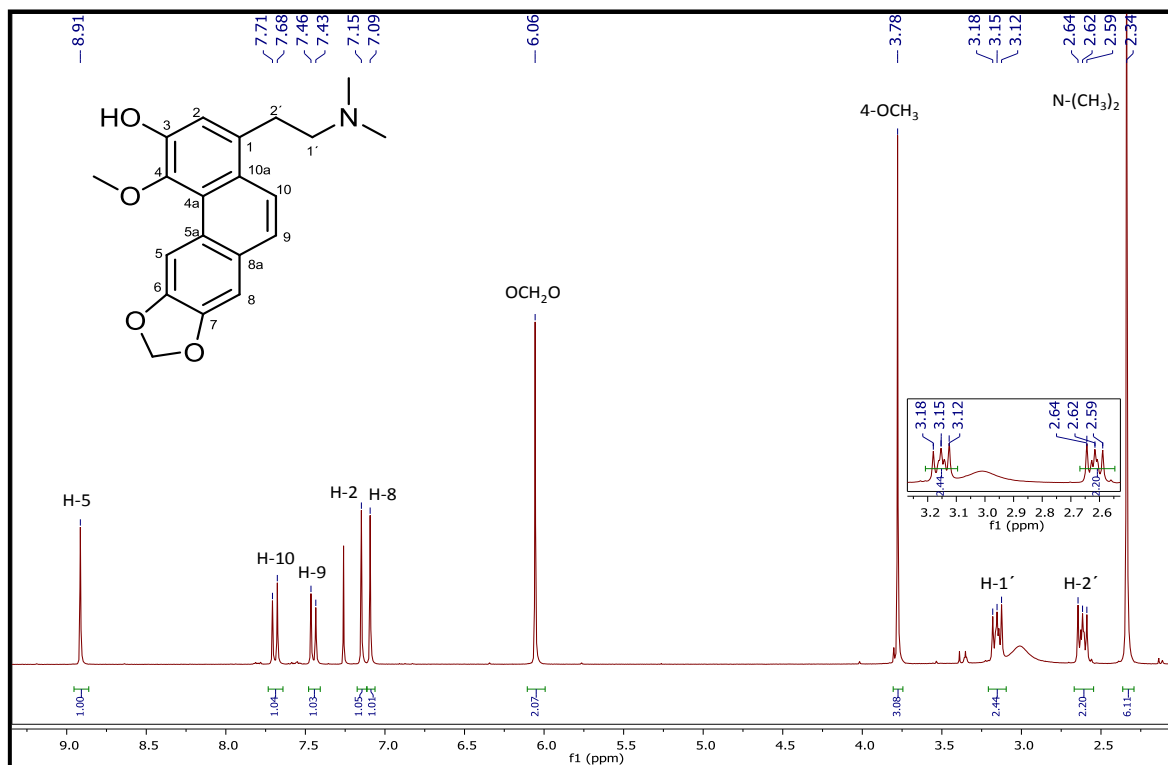


Figura 3-19. Espectro RMN ^1H de 3-O-demetilthalictuberina (Oc-17) (300 MHz, CDCl_3).

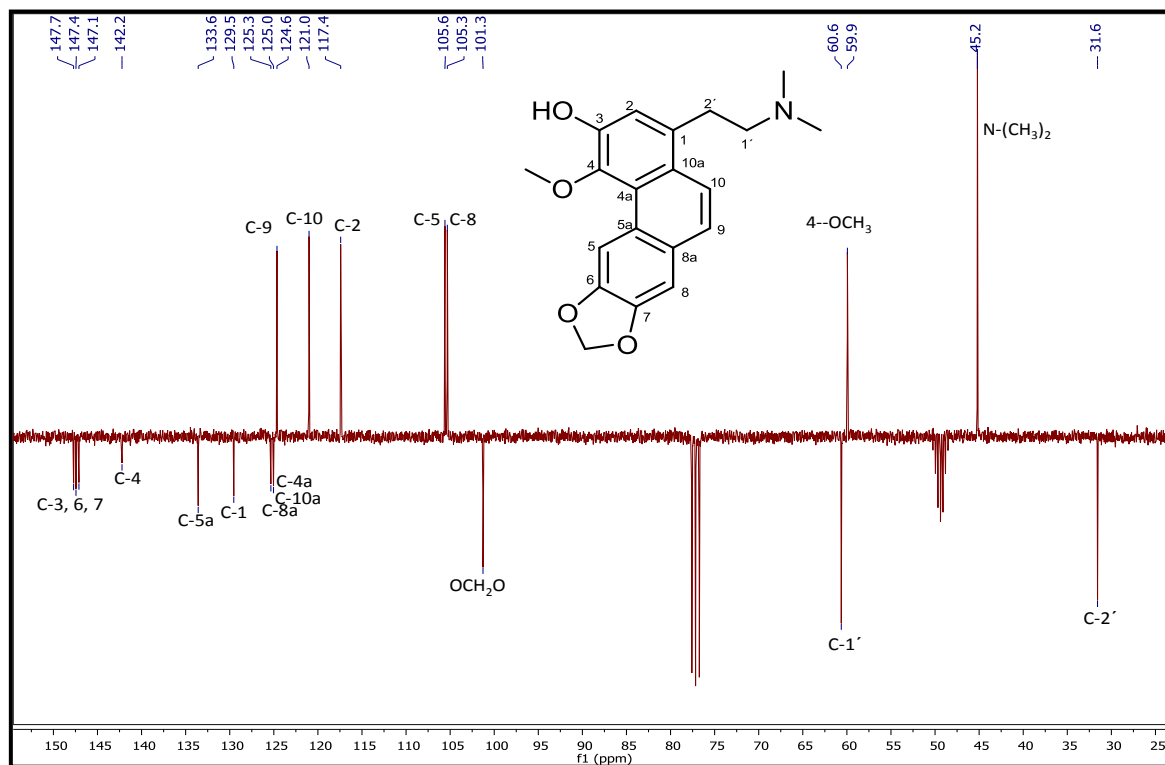
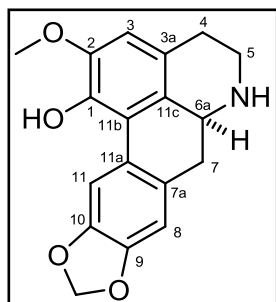


Figura 3-20. Espectro RMN ^{13}C de 3-O-demethylthalictuberina (Oc-17) (75 MHz, CDCl_3).



(+)-nordomesticina (Oc-20). Sólido café pálido. Punto de fusión $123\text{ }^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+25.3\text{ }^{\circ}$ ($c\ 0.04$, CHCl_3). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3,06 – 3,03 (m, 1H, Ha-4), 2,75 – 2,65 (m, 1H, Hb-4), 3,49 – 3,45 (m, 1H, Ha-5), 3,07 – 3,00 (m, 1H, Hb-5), 3,85 (dd, $J = 14,3$; 4,8 Hz, 1H, H-6a), 2,86 (dd, $J = 14,2$; 4,8 Hz, 1H, Heq-7), 2,75 – 2,81 (m, 1H, Hb-7), 6,56 (s, 1H, H-3), 6,73 (s, 1H, H-8), 7,96 (s, 1H, H-11), 3,91 (s, 3H, 2-OCH₃), 5,96 (dd, $J = 5,1$; 1,4 Hz, 2H, OCH₂O). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 146,1 (C-1), 138,6 (C-2), 109,3 (C-3), 118,9 (C-3a), 28,3 (C-4), 43,0 (C-5), 53,6 (6a), 37,0 (C-7), 129,5 (C-7a), 108,4 (C-8), 149,9 (C-9), 147,8 (C-10), 109,3 (C-11), 125,7 (C-11a), 115,1 (C-11b), 132,9 (C-11c), 56,1 (2-OCH₃), 100,9 (OCH₂O). MS-ESI $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ m/z 352; $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}]^+-41$ corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ [103, 111].

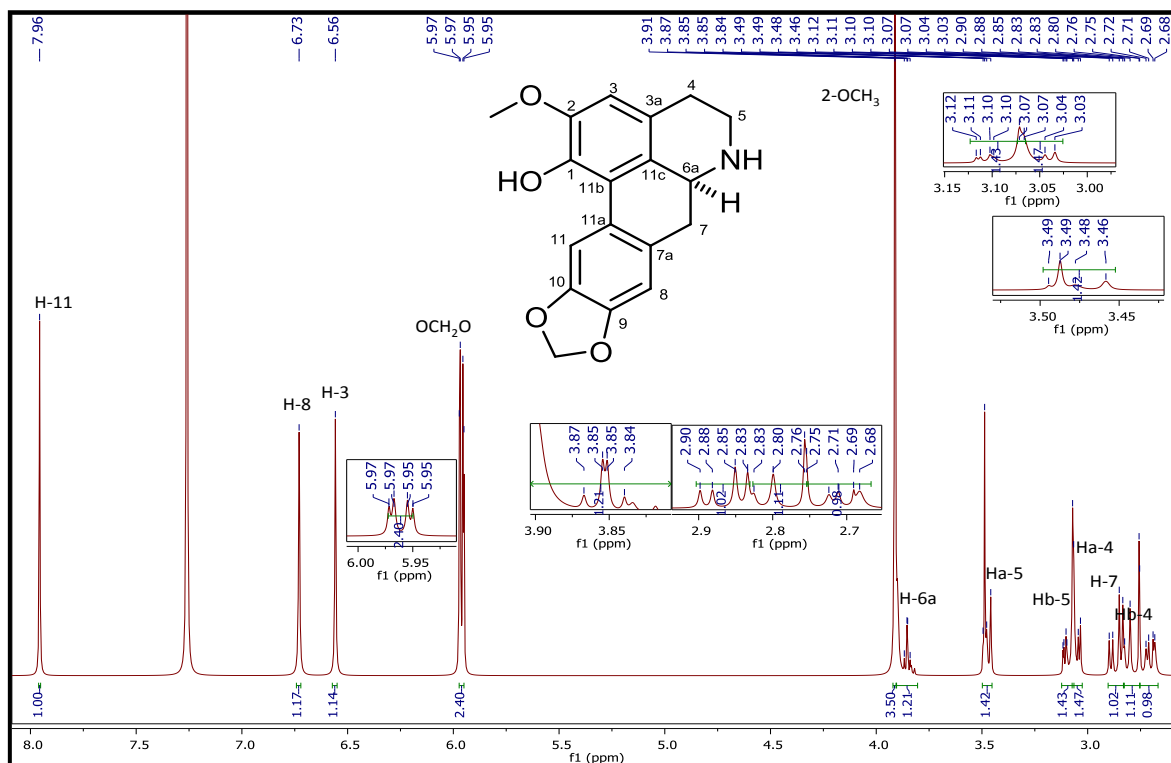


Figura 3-21. Espectro RMN ^1H de (+)-nordomesticina (Oc-20) (300 MHz, CDCl_3).

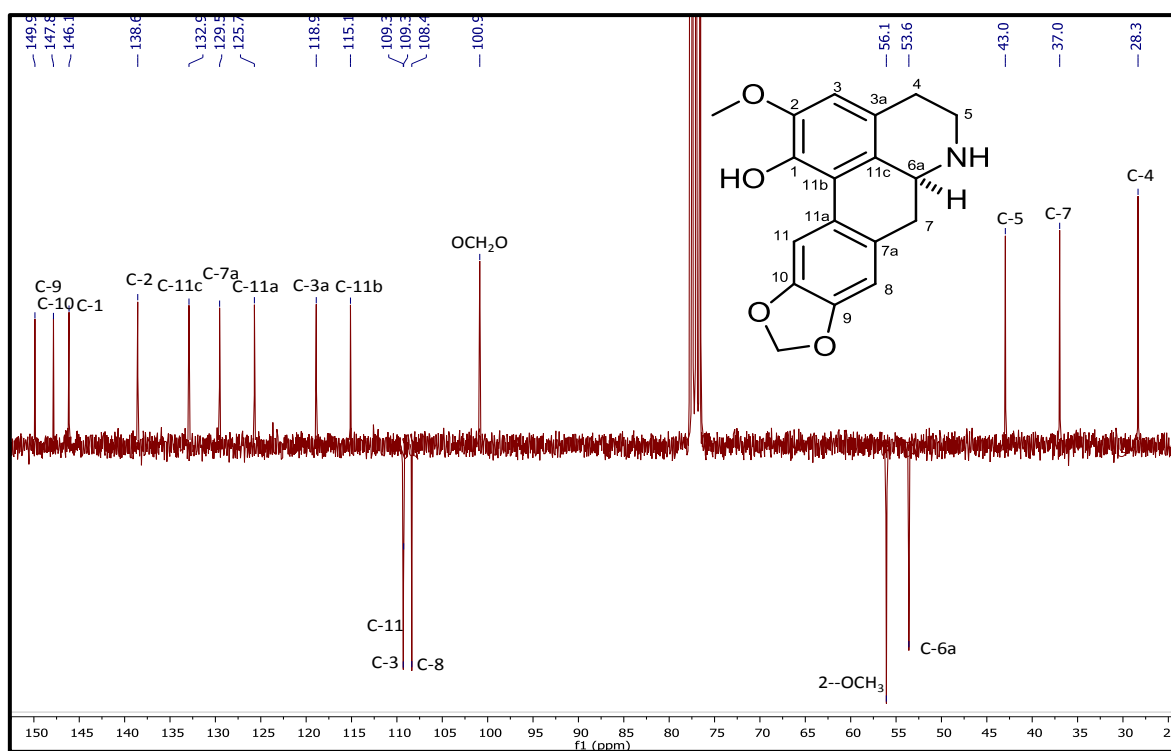
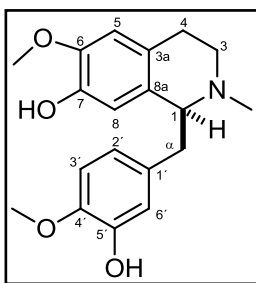


Figura 3-22. Espectro RMN ^{13}C de (+)-nordomesticina (Oc-20) (75 MHz, CDCl_3).



(+)-reticulina (Oc-24). Sólido amarillo. Punto de fusión 145 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +38.6° (c 0.02, CHCl₃). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H 3,71 (t, J = 6,1 Hz, 1H, H-1), 3,22 – 3,13 (m, 1H, Ha-3), 2,79 – 2,77 (m, 1H, Hb-3), 2,83 – 2,80 (m, 1H, Ha-4), 2,64 – 2,56 (m, 1H, Hb-4), 6,53 (s, 1H, H-5), 6,34 (s, 1H, H-8), 3,05 (dd, J = 14,07; 6,0 Hz Ha- α), 2,76 – 2,73 (m, 1H, Hb- α), 6,75 (d, J = 2,1 Hz, 1H, H-6'), 6,72 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-5'), 6,57 (dd, J = 8,2; 2,1 Hz, 1H, H-2'), 3,83 (s, 3H, 6-OCH₃), 3,84 (s, 6H, 4'-OCH₃), 2,47 (s, 3H, N-CH₃). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ_C 64,5 (C-1), 46,6 (C-3), 24,8 (C-4), 129,8 (C-4a), 110,7 (C-5), 145,2 (C-6), 143,5 (C-7), 113,9 (C-8), 124,9 (C-8a), 41,0 (C- α), 132,9 (C-1'), 115,8 (C-2'), 145,4 (C-3'), 145,5 (C-4'), 110,6 (C-5'), 121,0 (C-6'), 55,9 (6-OCH₃), 56,0 (4'-OCH₃), 42,3 (N-CH₃). MS-ESI [M]⁺ m/z 329 corresponde a la fórmula molecular C₁₉H₂₃NO₄ [114].

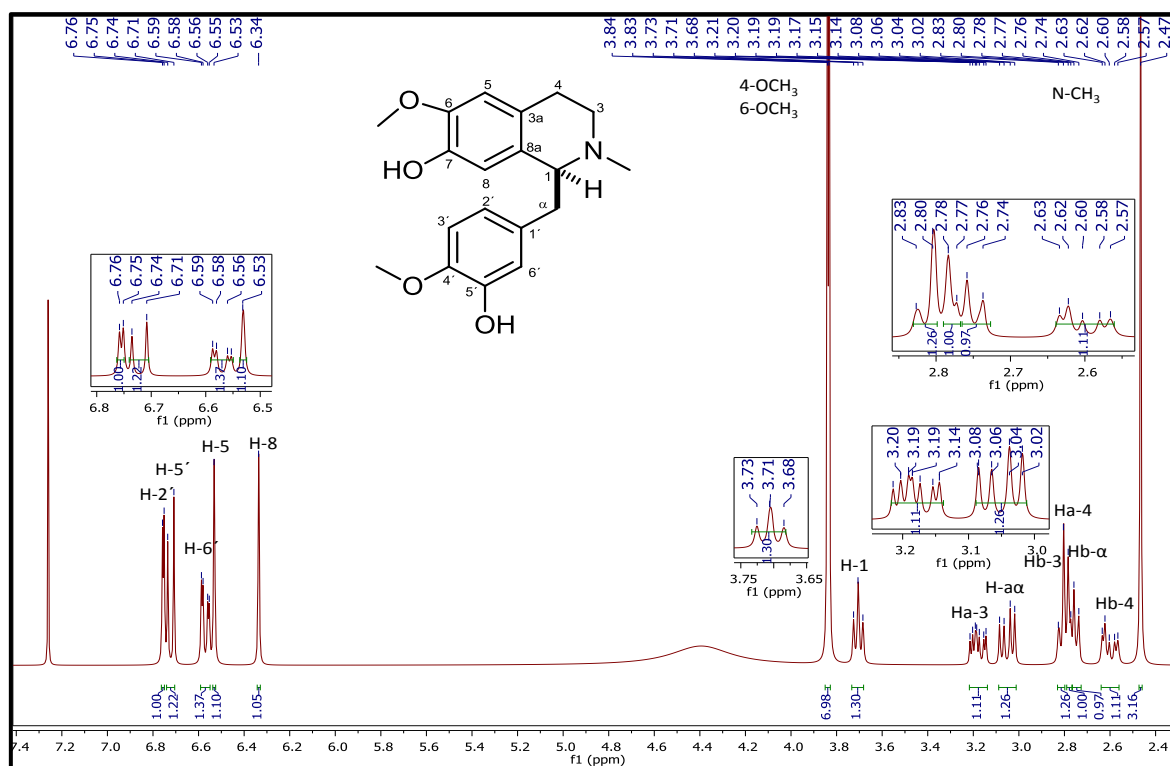


Figura 3-23. Espectro RMN ¹H de (+)-reticulina (Oc-24) (300 MHz, CDCl₃).

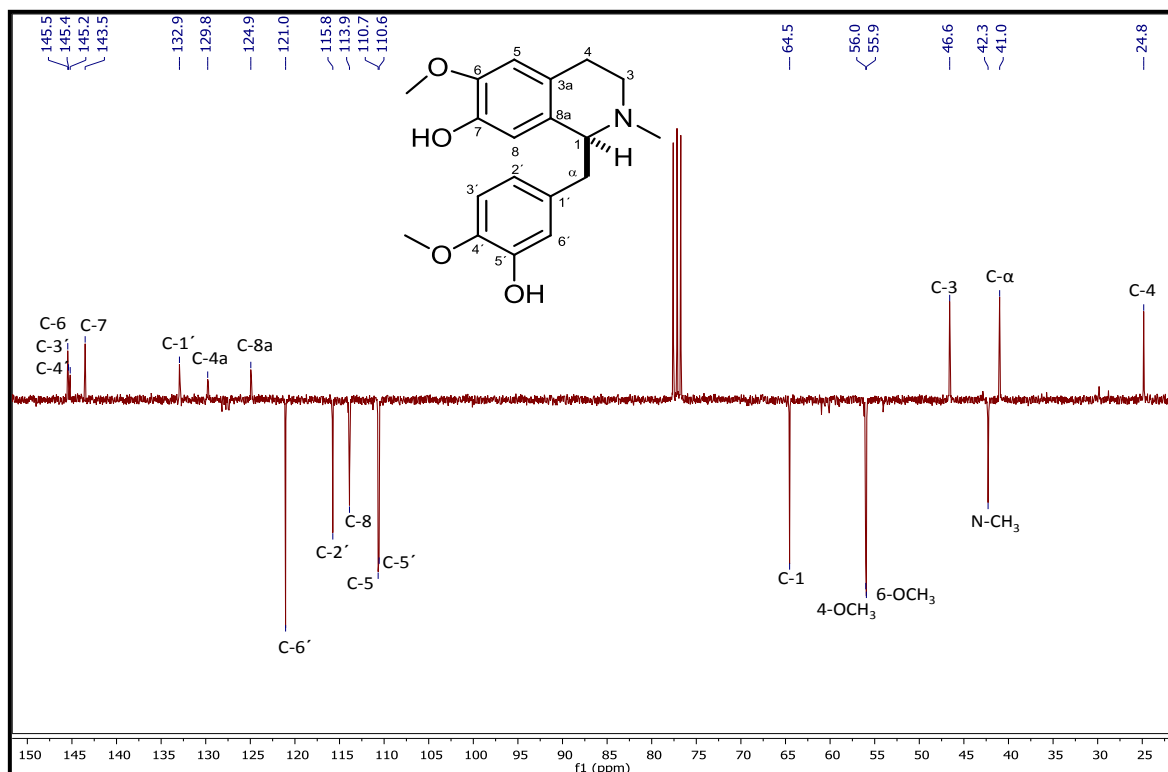
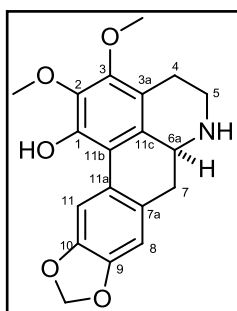


Figura 3-24. Espectro RMN ^{13}C de (+)-reticulina (Oc-24) (75 MHz, CDCl_3).



(+)-3-metoxinordomesticina (Oc-19). Sólido amarillo pálido. Punto de fusión 206 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +47.7° (*c* 0.07, CHCl_3). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 2,80 – 2,74 (m, 2H, H-4), 3,43 (dt, $J = 12,1$; 4,3 Hz, 1H, Ha-5), 2,92 (dt, $J = 12,0$, 8,4 Hz, 1H, Hb-5), 3,80 (dd, $J = 13,8$; 3,9 Hz, 1H, H-6a), 2,78 – 2,71 (m, 1H, Ha-7), 2,71 – 2,62 (m, 1H, Hb-7), 6,69 (s, 1H, H-8), 7,89 (s, 1H, H-11), 3,92 (s, 3H, 2-OCH₃), 3,85 (s, 3H, 3-OCH₃), 5,93 (dd, $J = 6,7$; 1,4 Hz, 2H, OCH₂O). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 145,8 (C-1), 138,9 (C-2), 148,7 (C-3), 118,2 (C-3a), 23,0 (C-4), 42,6 (C-5), 53,8 (6a), 36,6 (C-7), 129,1 (C-7a), 108,3 (C-8), 144,9 (C-9), 146,3 (C-10), 108,7 (C-11), 125,7 (C-11a), 115,8 (C-11b), 130,8 (C-11c), 60,9 (2-OCH₃), 60,0 (3-OCH₃), 100,9 (OCH₂O). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 342 (20), 341(100), 340 (92), 326 (24), 139 (20), 91 (47). $[\text{M}]^+$ m/z 341 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ [12, 115].

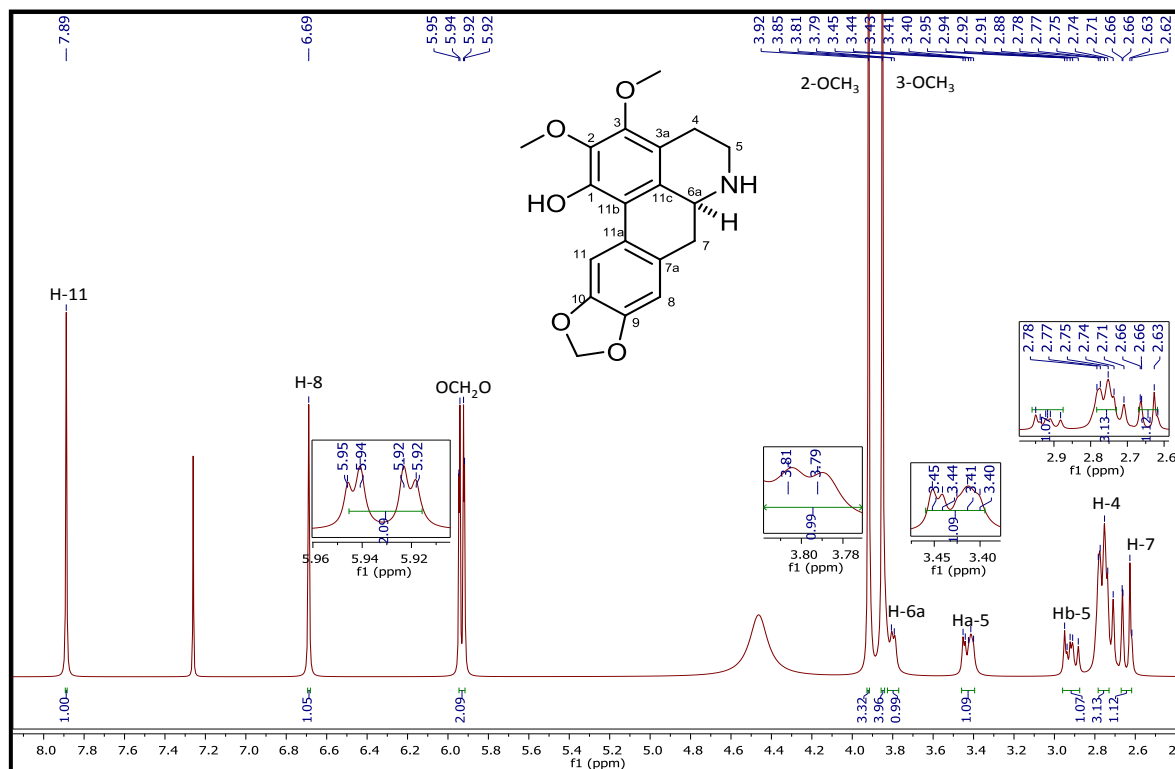


Figura 3-25. Espectro RMN ^1H de (+)-3-metoxinordomesticina (Oc-19) (300 MHz, CDCl_3).

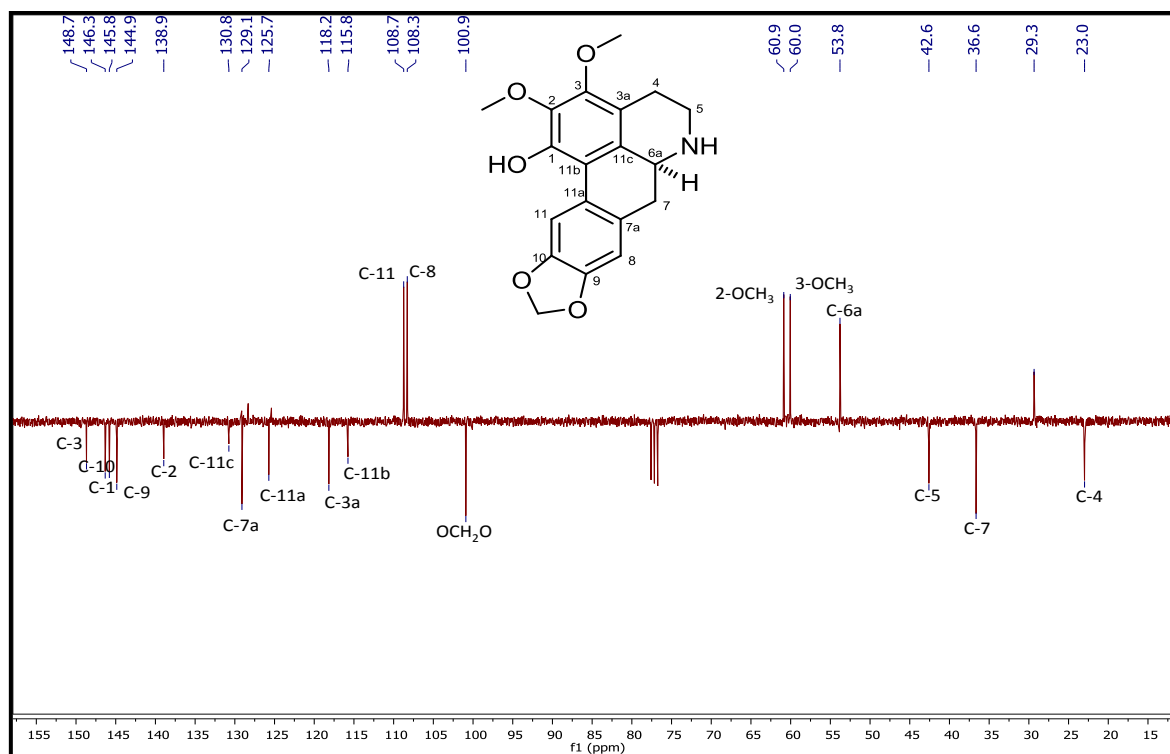
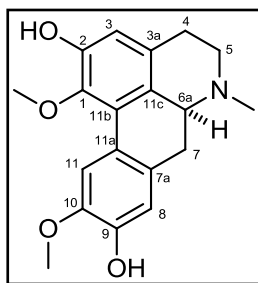


Figura 3-26. Espectro RMN ^{13}C de (+)-3-metoxinordomesticina (Oc-19) (75 MHz, CDCl_3).



(+)-boldina (Oc-23). Sólido amarillo. Punto de fusión 161 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +119.7° (c 0.03, CHCl_3). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3,15 – 3,06 (m, 1H, Ha-4), 2,66 – 2,55 (m, 1H, Hb-4), 3,06 – 2,98 (m, 1H, Ha-5), 2,52 – 2,43 (m, 1H, Hb-5), 3,02 – 2,99 (m, H-6a), 2,98 – 2,93 (m, 1H, Ha-7), 2,57 – 2,52 (m, 1H, Hb-7), 6,61 (s, 1H, H-3), 6,82 (s, 1H, H-8), 7,90 (s, 1H, H-11), 3,90 (s, 3H, 1-OCH₃), 3,59 s (s, 3H, 10-OCH₃), 2,52 (s, 3H, N-CH₃). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 142,2 (C-1), 148,2 (C-2), 113,4 (C-3), 130,1 (C-3a), 29,0 (C-4), 53,5 (C-5), 62,7 (6a), 34,3 (C-7), 130,4 (C-7a), 114,4 (C-8), 145,2 (C-9), 145,7 (C-10), 110,3 (C-11), 123,8 (C-11a), 126,1 (C-11b), 127,0 (C-11c), 56,3 (1-OCH₃), 60,4 (10-OCH₃), 44,1 (N-CH₃). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 328 (21), 327 (100). $[\text{M}]^+$ m/z 327 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ [116].

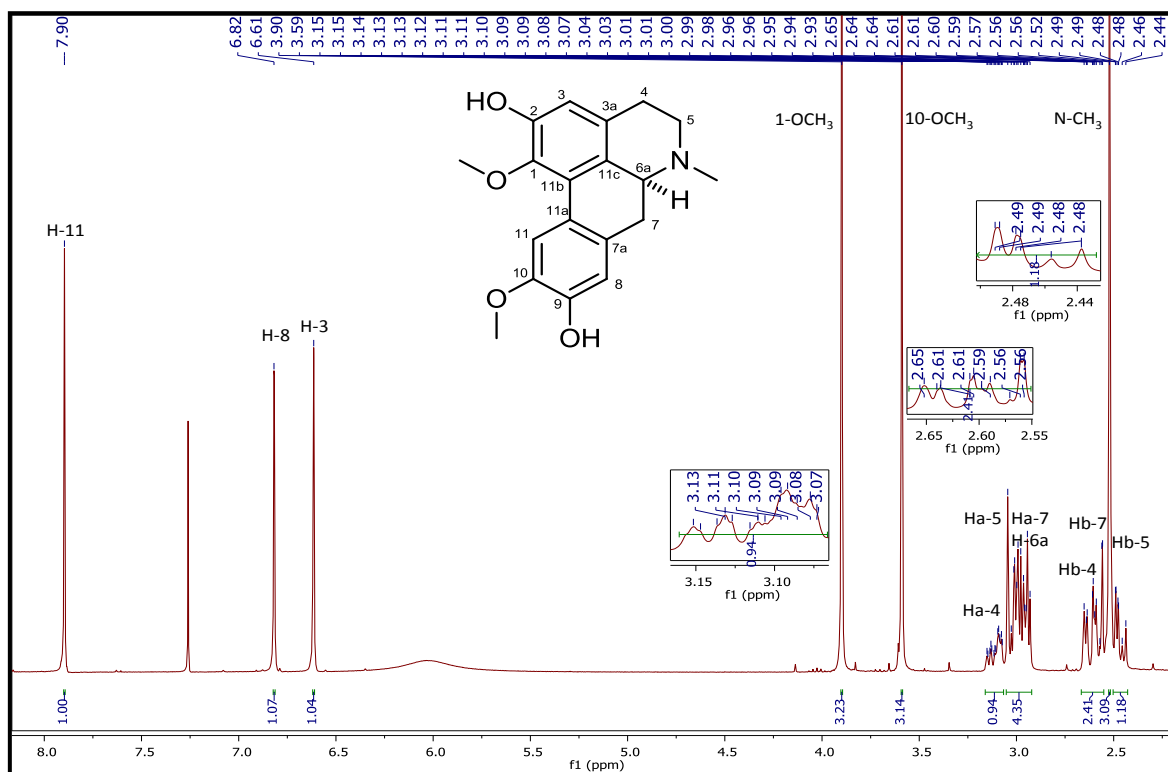


Figura 3-27. Espectro RMN ^1H de **(+)-boldina (Oc-23)** (300 MHz, CDCl_3).

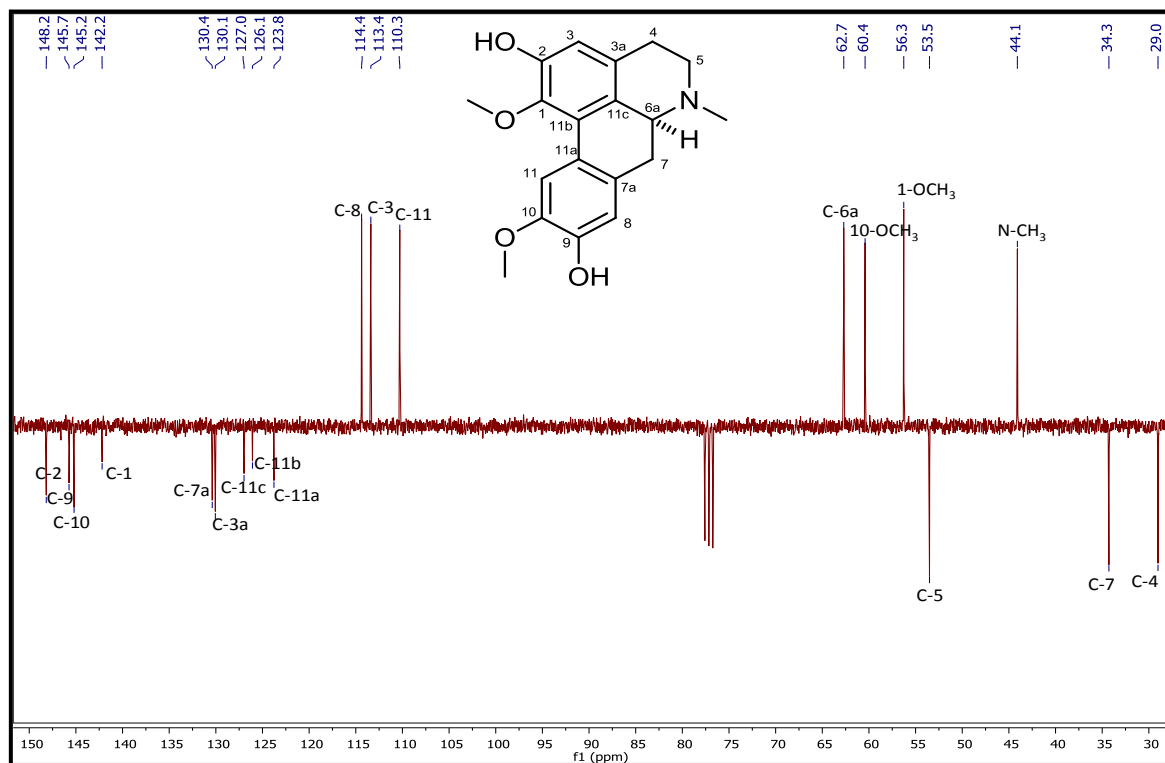
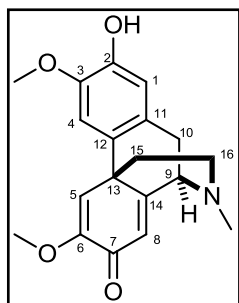


Figura 3-28. Espectro RMN ^{13}C de **(+)-boldina (Oc-23)** (75 MHz, CDCl_3).



(+)-palidina (Oc-25). Sólido verde. Punto de fusión $123\text{ }^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+31.8^{\circ}$ ($c\ 0.08$, CHCl_3). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 6,69 (s, 1H, H-1), 6,77 (s, 1H, H-4), 6,34 (s, 1H, H-5), 6,32 (s, 1H, H-8), 3,68 (d, $J = 5,9\text{ Hz}$, 1H, H-9), 3,31 (d, $J = 17,9\text{ Hz}$, 1H, $\text{H}\alpha$ -10), 2,98 (dd, $J = 18,0$; $6,1\text{ Hz}$, 1H, $\text{H}\beta$ -10), 1,93 (ddd, $J = 12,6$; $9,8$; $6,9\text{ Hz}$, 1H, $\text{H}\alpha$ -15), 1,82 (ddd, $J = 12,5$; $3,0$; $2,6\text{ Hz}$, 1H, $\text{H}\alpha$ -15), 2,61 – 2,55 (m, 2H, H-16), 3,89 (s, 3H, 3-OCH₃), 3,80 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,45 (s, 3H, N-CH₃). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 113,7 (C-1), 145,0 (C-2), 145,9 (C-3), 107,6 (C-4), 119,0 (C-5), 151,4 (C-6), 181,0 (C-7), 122,4 (C-8), 60,9 (C-9), 32,4 (C-10), 129,3 (C-11), 129,5 (C-12), 42,4 (C-13), 161,9 (C-14), 41,3 (C-15), 45,7 (C-16), 56,2 (3-OCH₃), 55,2 (6-OCH₃), 41,7 (N-CH₃). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 329 (100), 314 (33), 272 (63), 271 (66), 241 (65). $[\text{M}+2]^+$ m/z 329 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ [55].

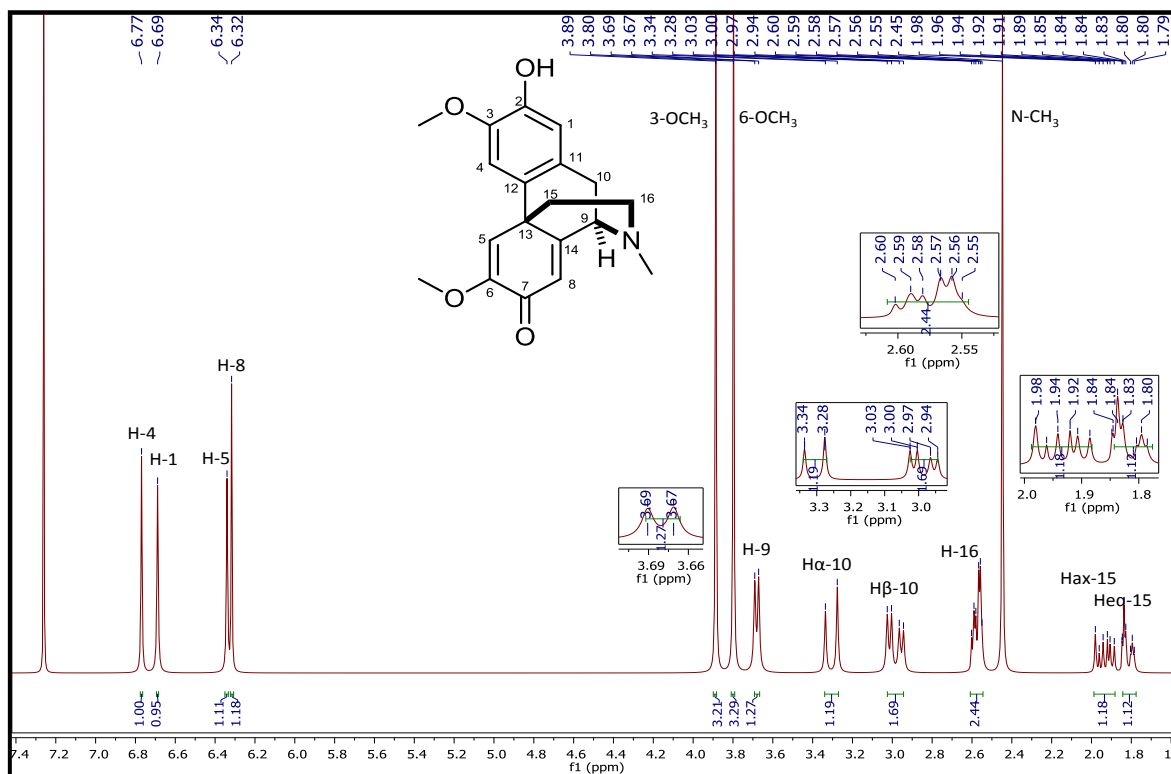


Figura 3-29. Espectro RMN ^1H de (+)-palidina (Oc-25) (300 MHz, CDCl_3).

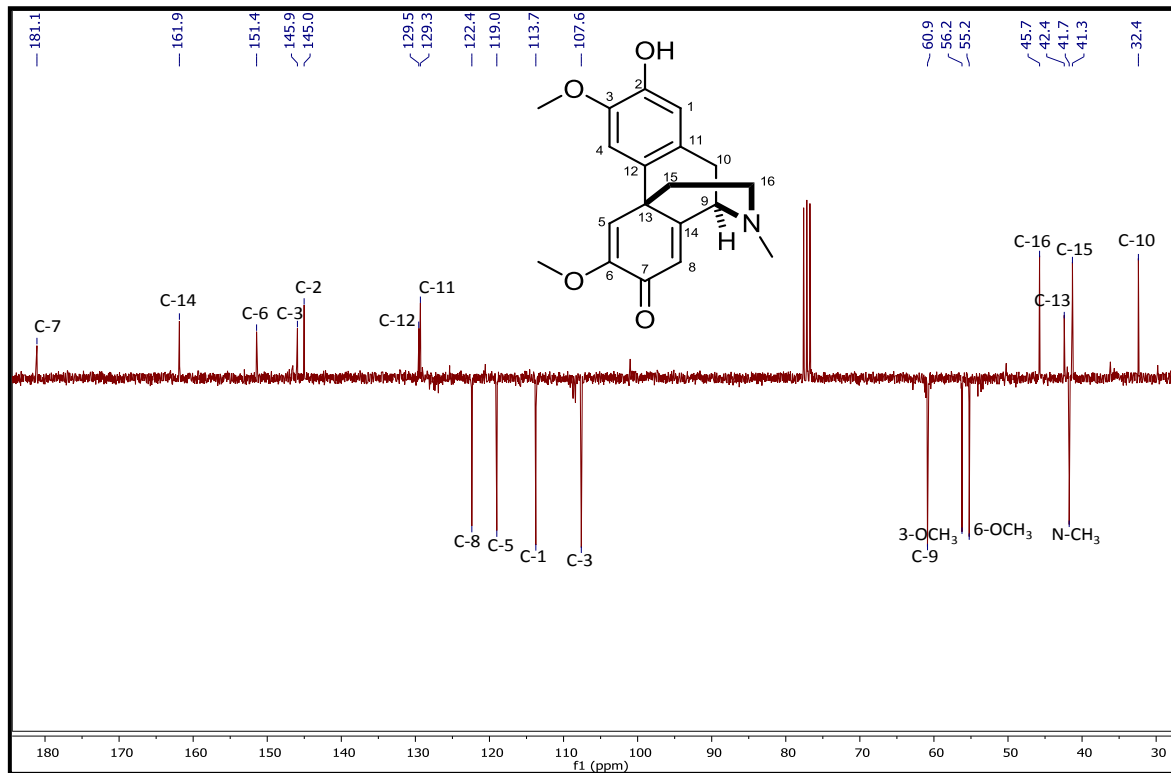
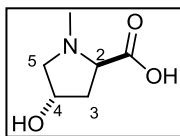


Figura 3-30. Espectro RMN ^{13}C de (+)-palidina (Oc-25) (75 MHz, CDCl_3).



(-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (Oc-26). Agujas incoloras. Punto de fusión 237 °C. $[\alpha]_D^{20}$: -88.8° (*c* 0.01, CH₃OH). RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ_H 4.46 (tt, *J* = 4,6; 2,2 Hz, 1H, H-4 α), 4.04 (dd, *J* = 10,8; 7,5 Hz, 1H, H-2), 3.80 (dd, *J* = 12,5; 4,6 Hz, 1H, H-5 α), 3.05 (dt, *J* = 12,6; 2,0 Hz, 1H, H-5 β), 2.98 (s, 3H, *N*-CH₃), 2.41 (ddt, *J* = 13,9; 7,5; 2,0 Hz, 1H, H-3 α), 2.13 (ddd, *J* = 13,8; 10,8; 4,7 Hz, 1H, H-3 β). RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ_C 172,7 (C=O), 71,8 (C-2), 70,9 (C-4), 64,2 (C-5), 44,0 (*N*-CH₃), 40,3 (C-3). MS-ESI [M]⁺ *m/z* 145 corresponde a la fórmula molecular C₆H₁₁NO₃ [117].

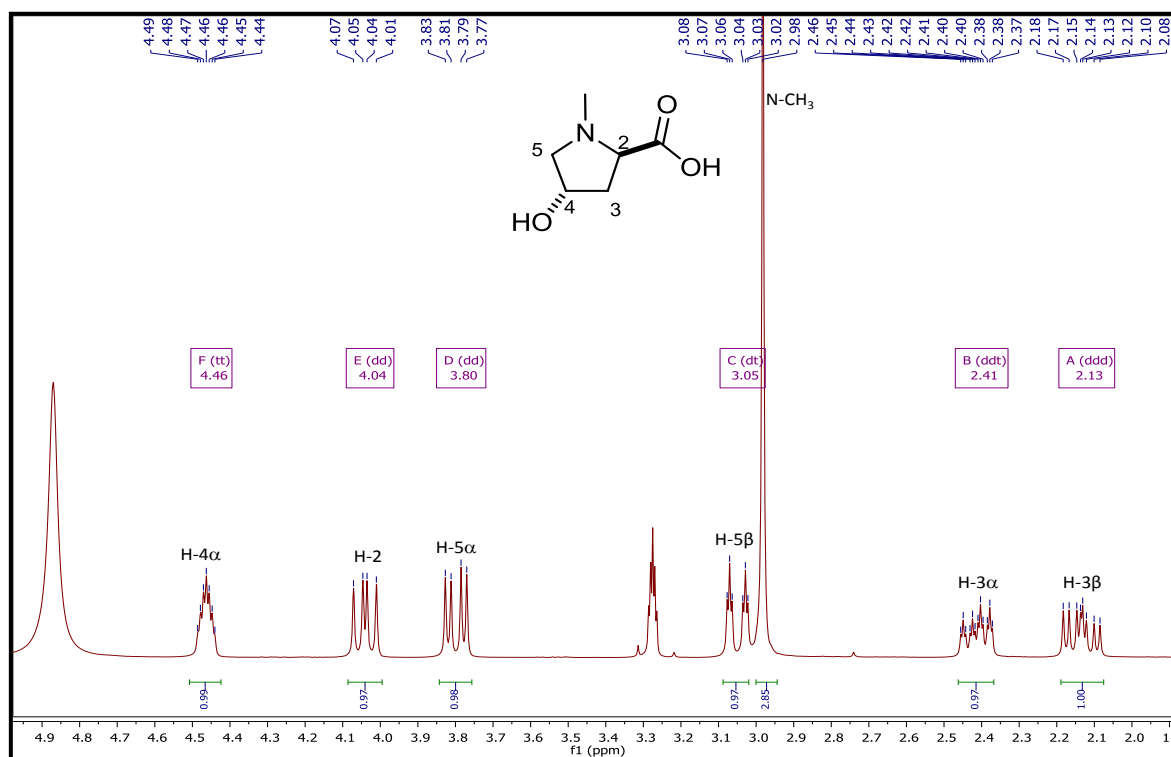


Figura 3-31. Espectro RMN ¹H de (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (Oc-26) (300 MHz, CD₃OD).

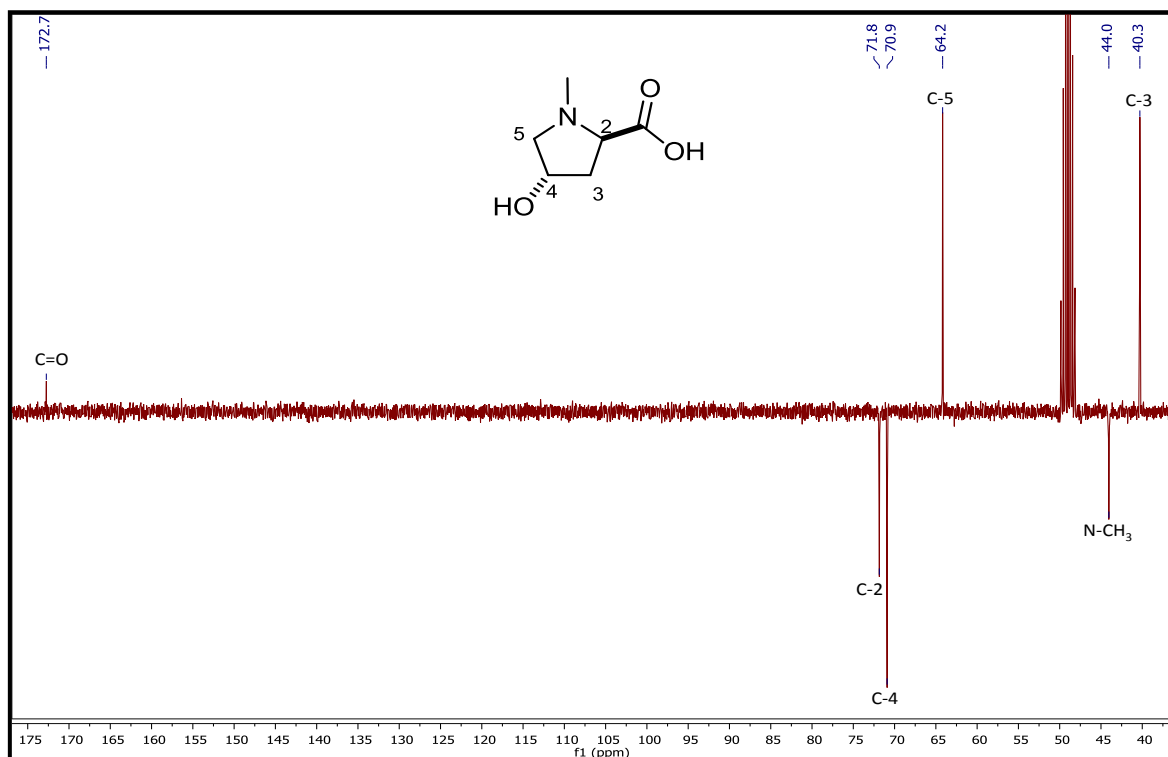
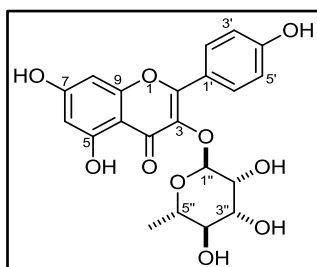


Figura 3-32. Espectro RMN ^{13}C de (-)-*trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (Oc-26) (75 MHz, CD_3OD).

3.1.3 Datos espectroscópicos de los flavonoides y fenoles conocidos aislados de hojas de *O. caudata*.



Afzelina (Oc-13). Sólido amarillo. Punto de fusión 217 °C (se descompone). RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ_{H} 0,93 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H, H-6''), 4,24 (sa, 1H, H-5''), 3,34 (d, $J = 3,1$ Hz, 2H, H-2'' y H-3'), 3,74 (sa, 1H, H-4'), 5,37 (s, 1H, H-1'), 6,37 (sa, 1H, H-8), 6,19 (sa, 1H, H-6), 6,93 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-5' y H-3'), 7,75 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-6' y H-2'). RMN ^{13}C (75 MHz,

CD_3OD) δ_{C} 17,6 (C-6''), 71,9 (C-5''), 72,0 (C-2''), 72,1 (C-4'), 73,2 (C-3'), 103,4 (C-1'), 94,9 (C-8), 100,0 (C-6), 105,8 (C-10), 116,5 (C-5'), 161,6 (C-4'), 116,5 (C-3'), 122,5 (C-1'), 131,8 (C-6'), 131,8 (C-2'), 136,1 (C-3), 158,5 (C-9), 159,2 (C-2), 163,1 (C-5), 166,2 (C-7), 179,5 (C-4). HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 433.1129 (calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ en 433.1134) [118, 119].

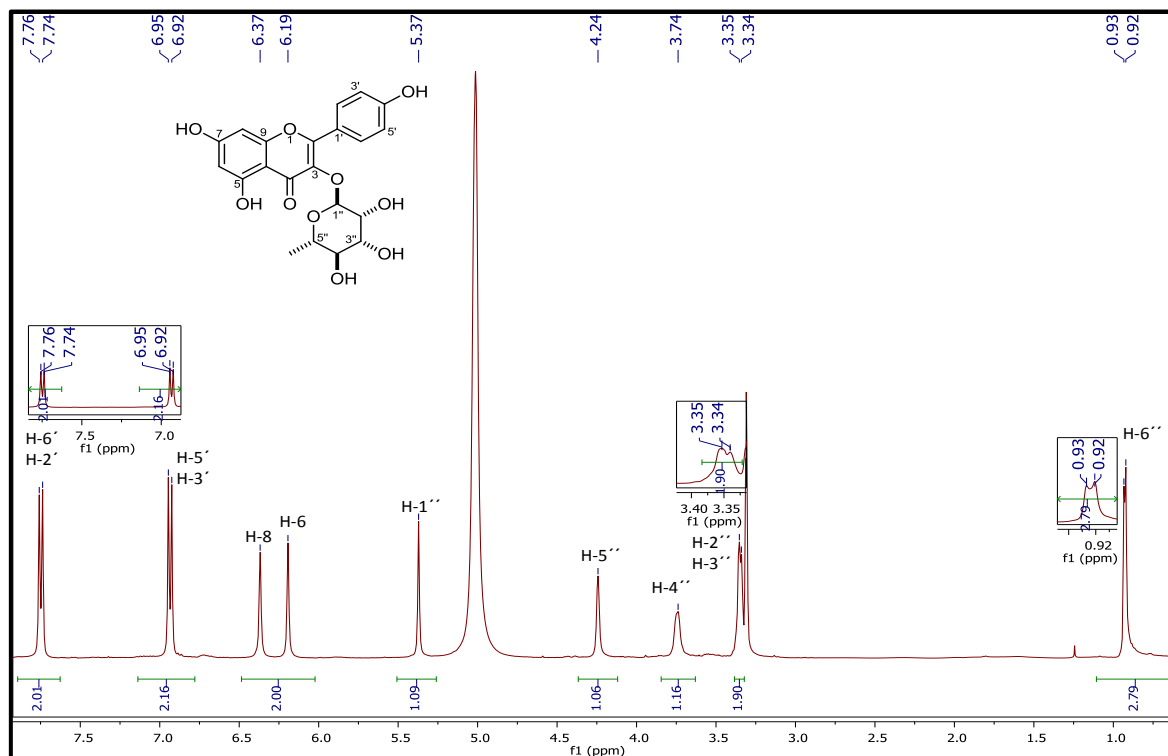


Figura 3-33. Espectro RMN ^1H de Afzelina (Oc-13) (300 MHz, CD_3OD).

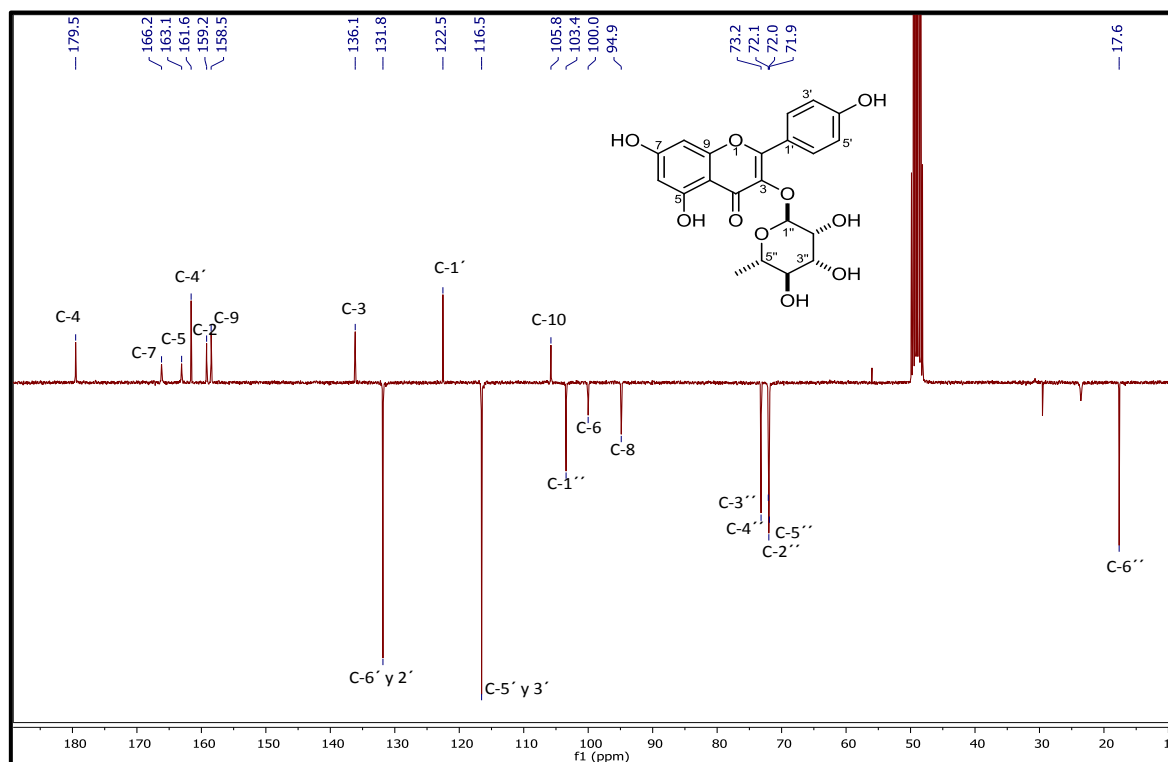
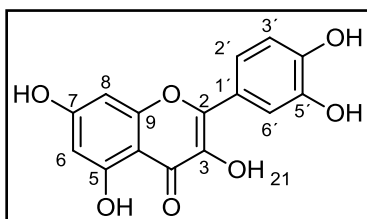


Figura 3-34. Espectro RMN ^{13}C de Afzelina (Oc-13) (75 MHz, CD_3OD).



Quercetina (Oc-12). Sólido amarillo. Punto de fusión 250 °C. RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ_{H} 6,20 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-6), 6,41 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-8), 7,65 (dd, $J = 8,6$, 2,1 Hz, 1H, H-2'), 6,90 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-3'), 7,76 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-6'). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} 148,0 (C-2), 137,2 (C-3), 177,3 (C-4), 162,5 (C-5), 99,2 (C-6), 165,6 (C-7), 94,4 (C-8), 158,2 (C-9), 104,5 (C-10), 124,1 (C-1'), 121,6 (C-2'), 148,8 (C-5'), 146,2 (C-4'), 116,2 (C-3'), 115,9 (C-6'). MS-ESI $[\text{M}]^+$ m/z 302 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ [120].

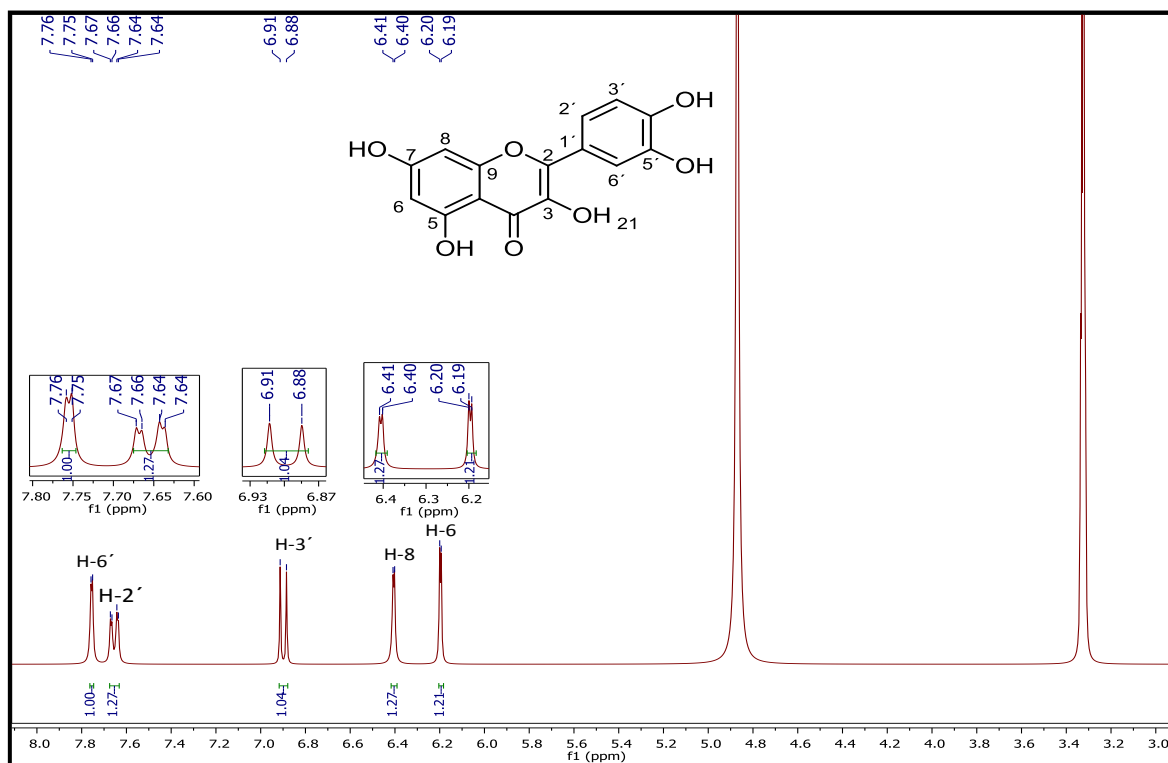


Figura 3-35. Espectro RMN ^1H de Quercetina (Oc-12) (300 MHz, CD_3OD).

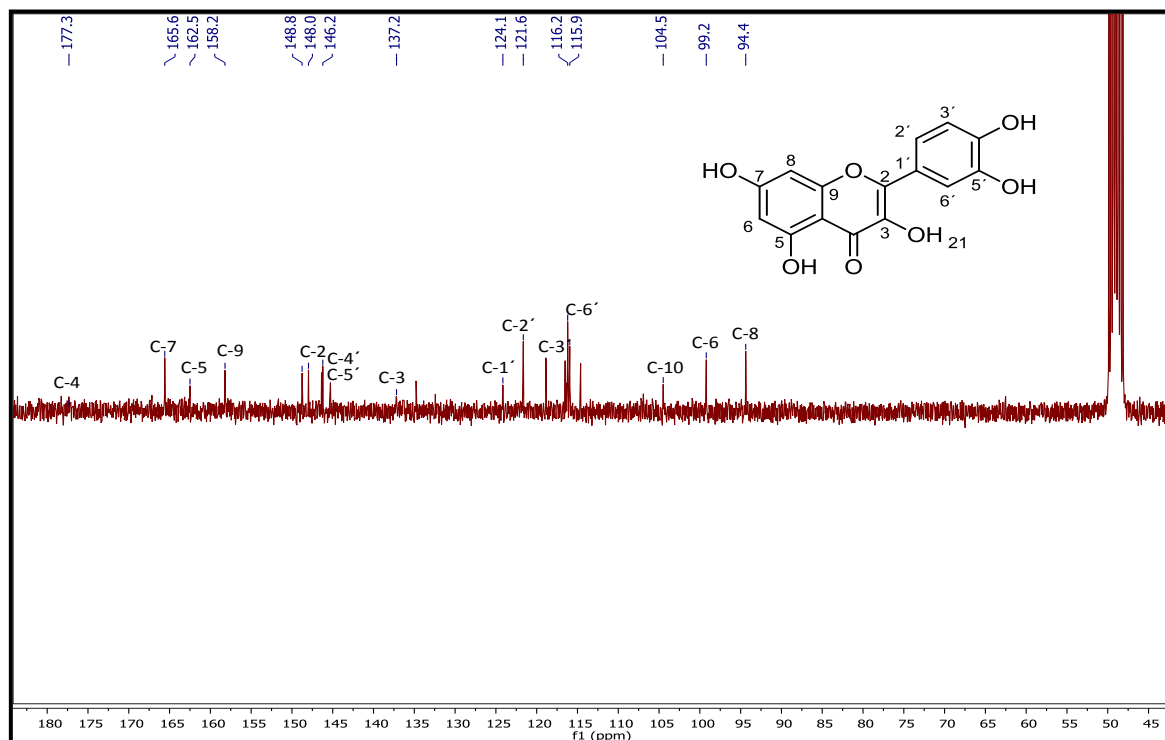


Figura 3-36. Espectro RMN ^{13}C de la Quercetina (Oc-12) (75 MHz, CD_3OD).

Mezcla de astragalina (Oc-14) e isoquercitrina (Oc-15). Sólido amarillo.

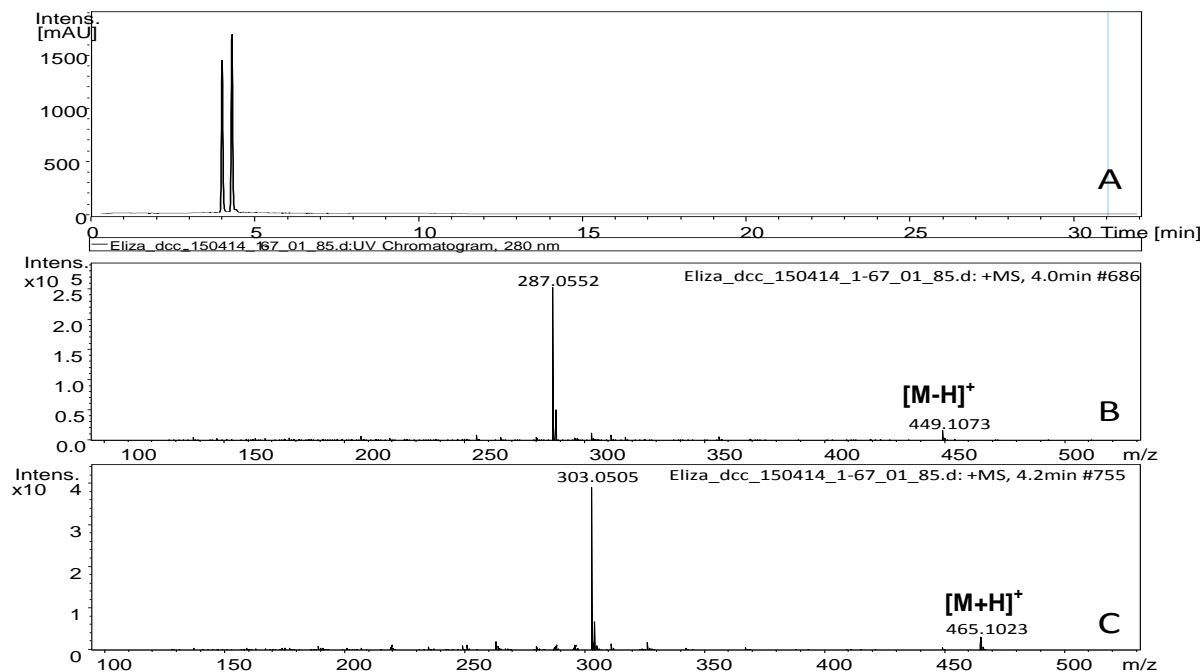
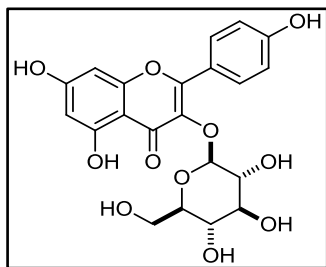


Figura 3-37. Perfil cromatográfico a 280 nm de la mezcla Oc-14 y Oc-15 y espectro de masas de Oc-14 y Oc-15. A. Cromatograma HPLC a 280 nm, columna Luna C18 de 150 x 2.0 mm, 3 μm . B. Espectro de masas HRMS-ESI modo positivo de la astragalina (Oc-14). C. Espectro de masas HRMS-ESI modo positivo de la isoquercitrina (Oc-15).



Astragalina (Oc-14): RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ_{H} 6,20 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-6), 6,39 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-8), 8,08 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H-2' y H-6'), 6,87 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H-3' y H-5'), 5,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-1''), 3,85 – 3,41 (m, 5H, H-2'' – 6''). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} 159,1 (C-2), 135,5 (C-3), 179,6 (C-4), 163,1 (C-5), 99,9 (C-6), 166,2 (C-7), 94,8 (C-8), 158,4 (C-9), 105,7 (C-10), 122,8 (C-1'), 132,3 (C-2'), 116,0 (C-3'), 161,5 (C-4'), 116,1 (C-5'), 132,4 (C-6'), 62,5 (C-6''), 78,5 (C-5''), 75,8 (C-2''), 71,3 (C-4''), 78,1 (C-3''), 104,1 (C-1''). HRMS-ESI $[\text{M}-\text{H}]^+$ m/z 449.1073 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{O}_3$ en 449.1084) [121].

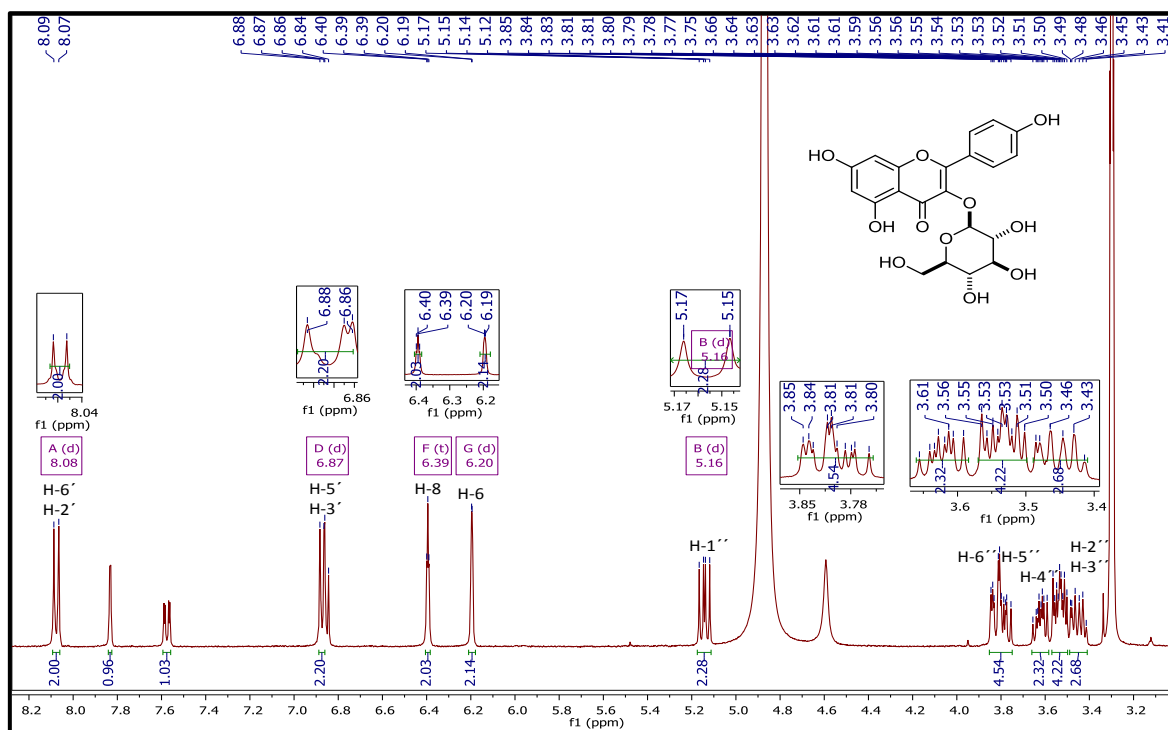


Figura 3-38. Espectro RMN ^1H de la **Astragalina (Oc-14)** en la mezcla (300 MHz, CD_3OD).

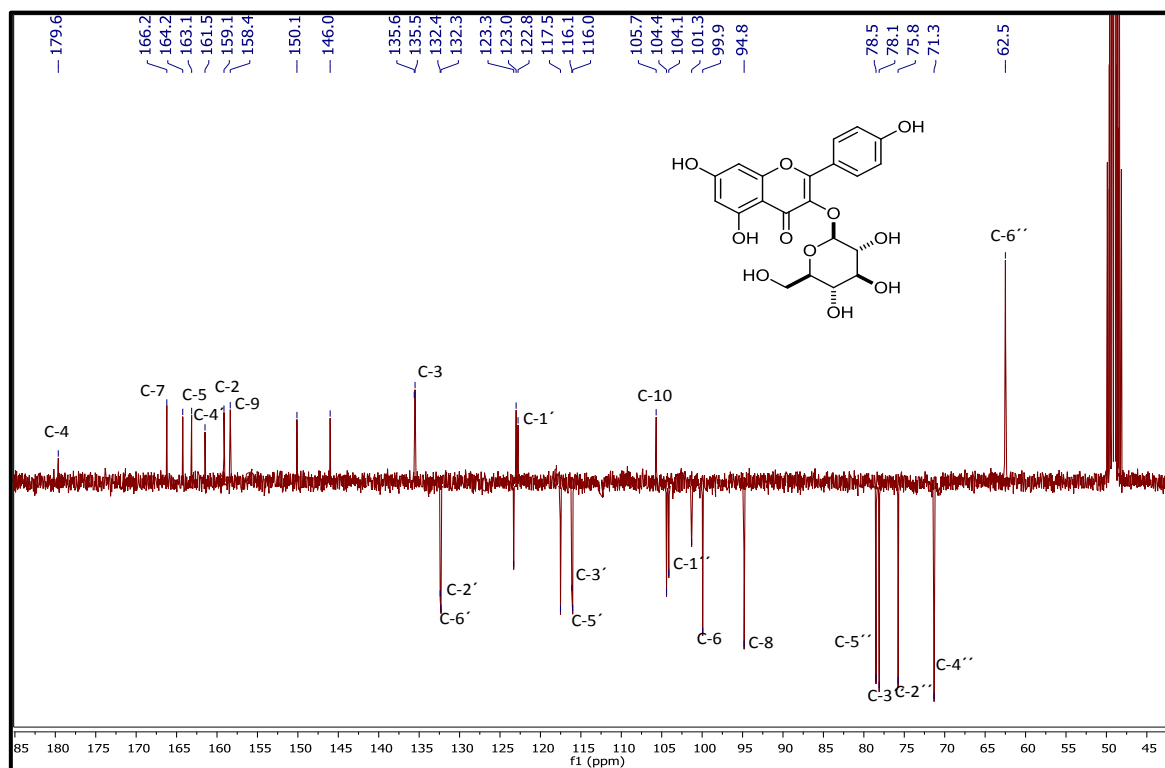
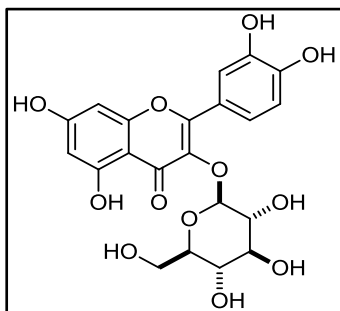


Figura 3-39. Espectro RMN ^{13}C de la **Astragalina (Oc-14)** en la mezcla (75 MHz, CD_3OD).



Isoquercitrina (Oc-15): RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ_{H} 6,20 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-6), 6,39 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-8), 7,58 (dd, $J = 8,5; 2,2$ Hz, 1H, H-2'), 6,85 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-5'), 7,83 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-6'), 5,13 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H-1''), 3,85–3,41 (m, 5H, H-2''–6''). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} 159,1 (C-2), 135,6 (C-3), 179,6 (C-4), 163,1 (C-5), 99,9 (C-6), 166,2 (C-7), 94,8 (C-8), 158,4 (C-9), 105,7 (C-10), 123,0 (C-1'), 123,3 (C-2'), 146,0 (C-3'), 150,1 (C-4'), 116,1 (C-5'), 117,5 (C-6'), 62,5 (C-6''), 78,5 (C-5''), 75,8 (C-2''), 71,3 (C-4''), 78,1 (C-3''), 104,4 (C-1''). HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 465.1023 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{O}_4$ en 465.1033) [122].

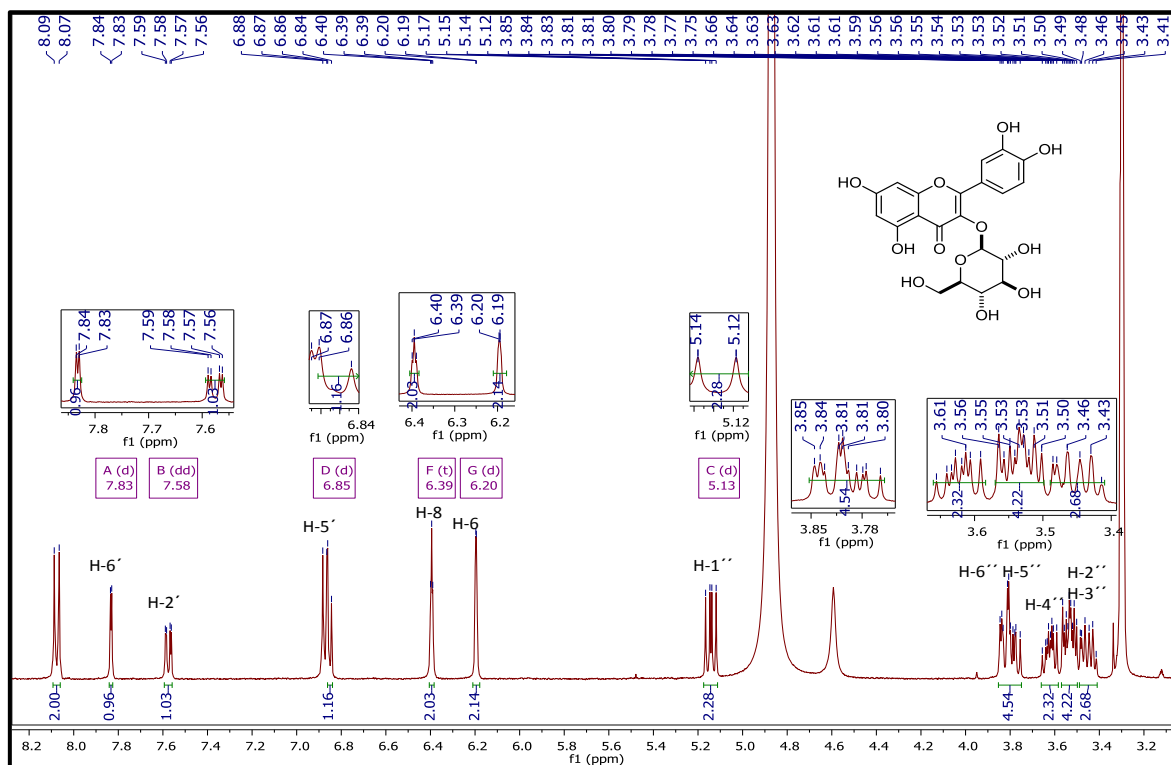


Figura 3-40. Espectro RMN ^1H de la Isoquercitrina (Oc-15) en la mezcla (300 MHz, CD₃OD).

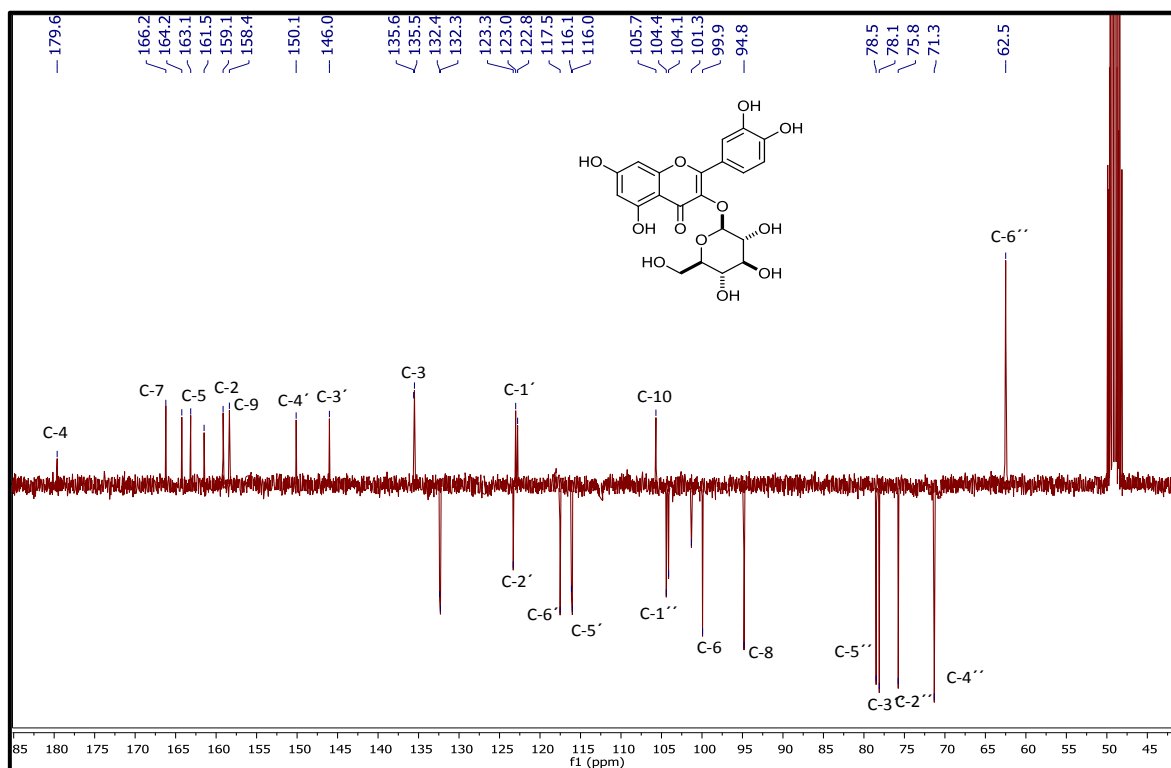
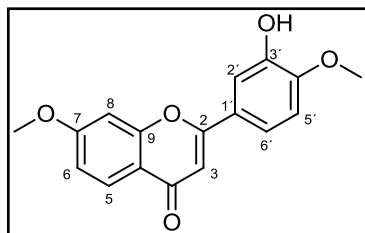


Figura 3-41. Espectro RMN ^{13}C de la Isoquercitrina (Oc-15) en la mezcla (75 MHz, CD₃OD).



7,4'-Dimetoxi-3'-hidroxiflavona (Oc-10). Sólido amarillo.

Punto de fusión 191 °C. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 6,68 (s, 1H, H-3), 8,12 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, H-5), 7,01 – 6,98 (m, 1H, H-6), 6,95 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, H-8), 7,51 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-2'), 6,98 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-5'), 7,46 (dd, $J = 8,4$; 2,2; Hz, 1H, H-6'), 3,98 (s, 3H, 7-OCH₃), 3,93 (s, 3H, 4'-OCH₃). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 162,8 (C-2), 106,0 (C-3), 176,2 (C-4), 127,0 (C-5), 114,4 (C-6), 164,0 (C-7), 100,5 (C-8), 157,8 (C-9), 117,8 (C-10), 123,7 (C-1'), 112,4 (C-2'), 146,1 (C-3'), 150,0 (C-4'), 112,0 (C-5'), 118,8 (C-6'), 56,3 (7-OCH₃), 55,9 (4'-OCH₃). HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 299.0908 (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5$ en 299.0919) [123].

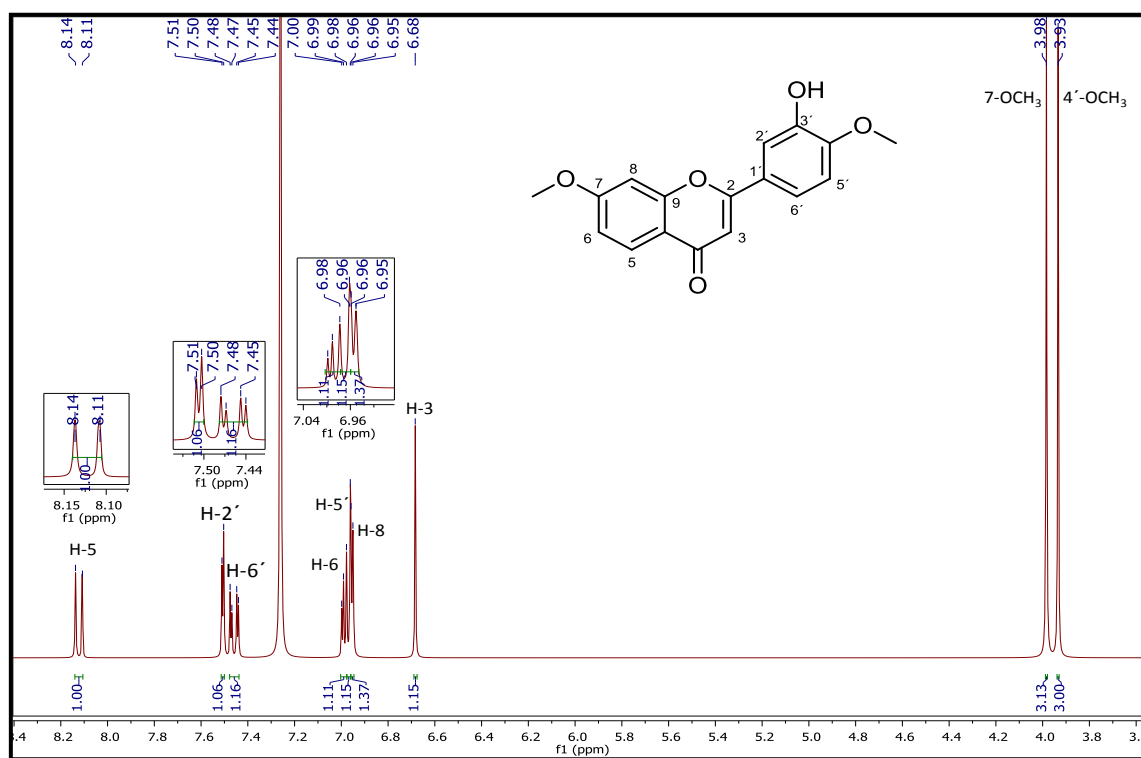


Figura 3-42. Espectro RMN ^1H de 7,4'-Dimetoxi-3'-hidroxiflavona (Oc-10) (300 MHz, CDCl_3).

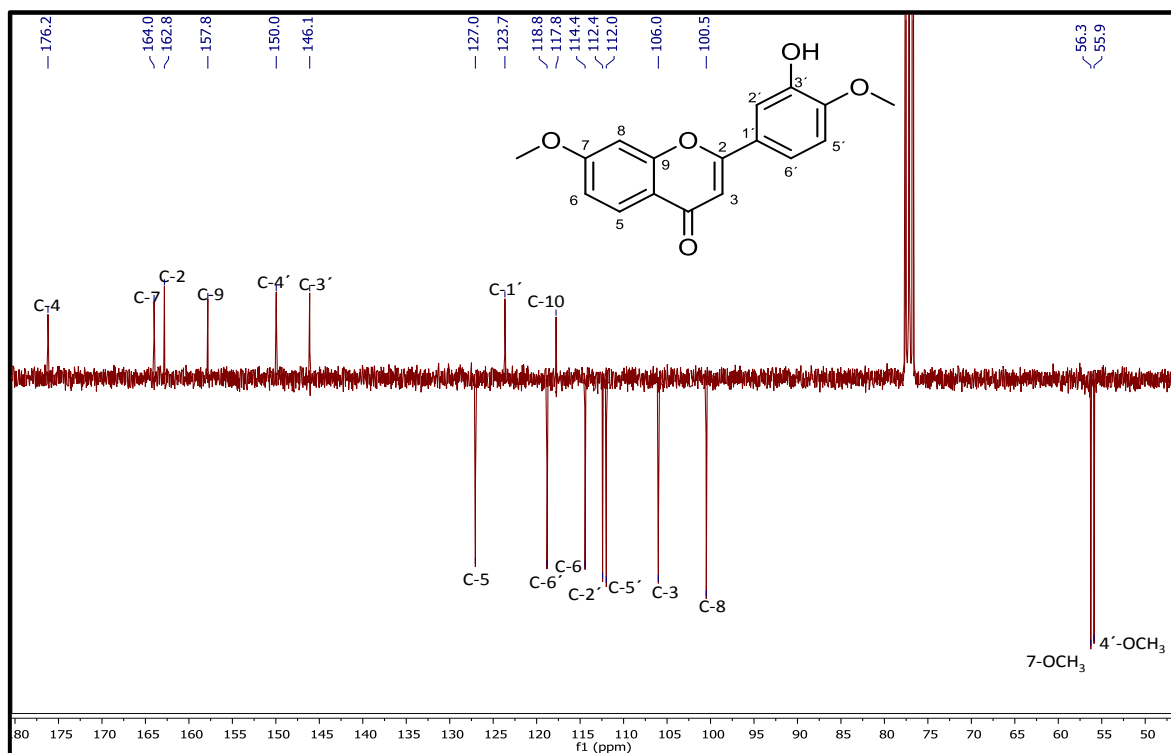


Figura 3-43. Espectro RMN ^{13}C de 7,4'-Dimetoxi-3'-hidroxiflavona (Oc-10) (75 MHz, CDCl_3).

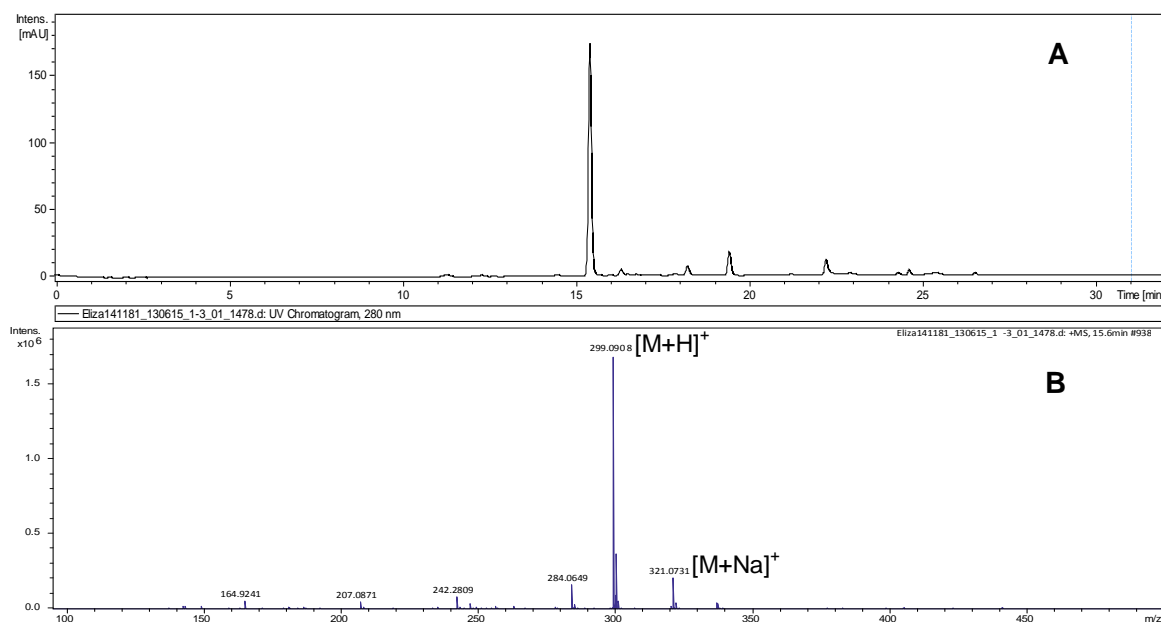
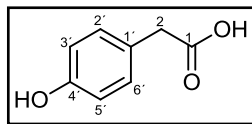


Figura 3-44. Perfil cromatográfico a 280 nm y espectro de masas de Oc-10. **A.** Cromatograma HPLC a 280 nm, columna Luna C18 de 150 x 2.0 mm, 3 μm . **B.** Espectro de masas HRMS-ESI modo positivo.



Ácido *p*-hidroxifenilacético (Oc-11): Sólido amarillo pálido. Punto de fusión: 148 °C. RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ_{H} 3,48 (s, 2H, H-2), 7,09 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2' y 6'), 6,72 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3' y 5'). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} 176,6 (C-1), 41,3 (C-2), 127,4 (C-1'), 131,3 (C-2' y 6'), 116,2 (C-3' y 5'), 157,7 (C-4'). MS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 153 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3$ [124].

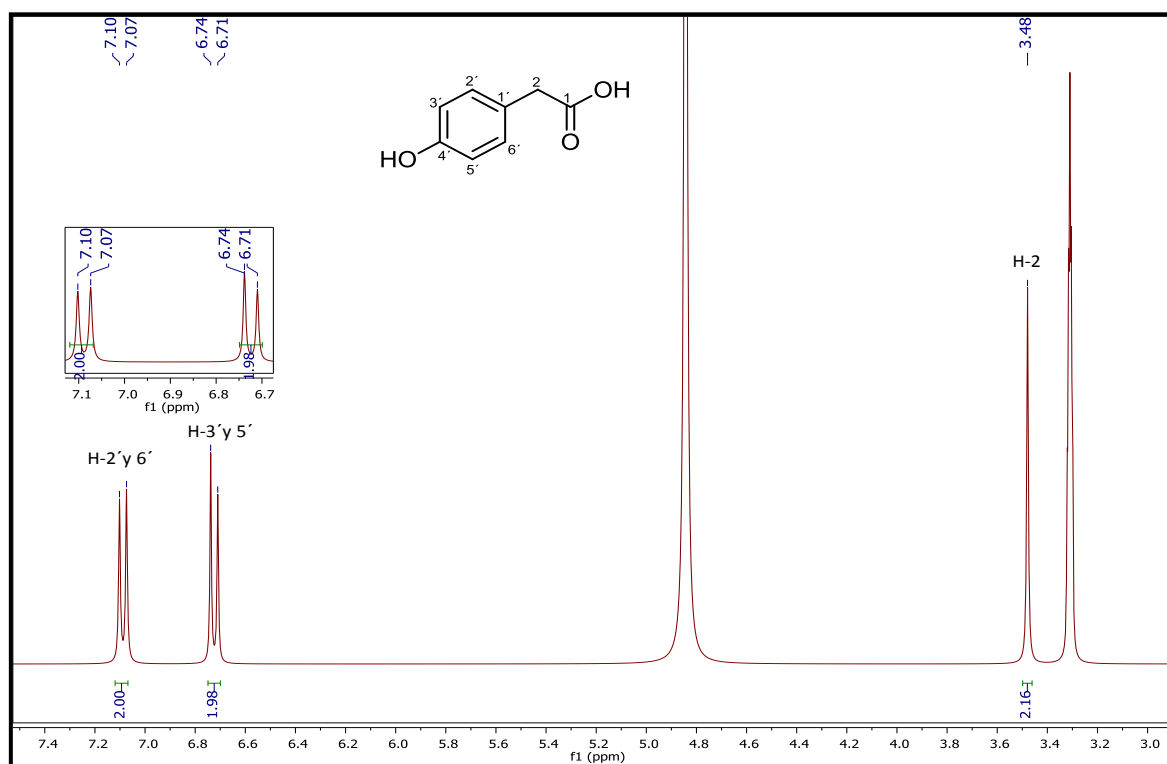


Figura 3-45. Espectro RMN ^1H de **Ácido *p*-hidroxifenilacético (Oc-11)** (300 MHz, CD_3OD).

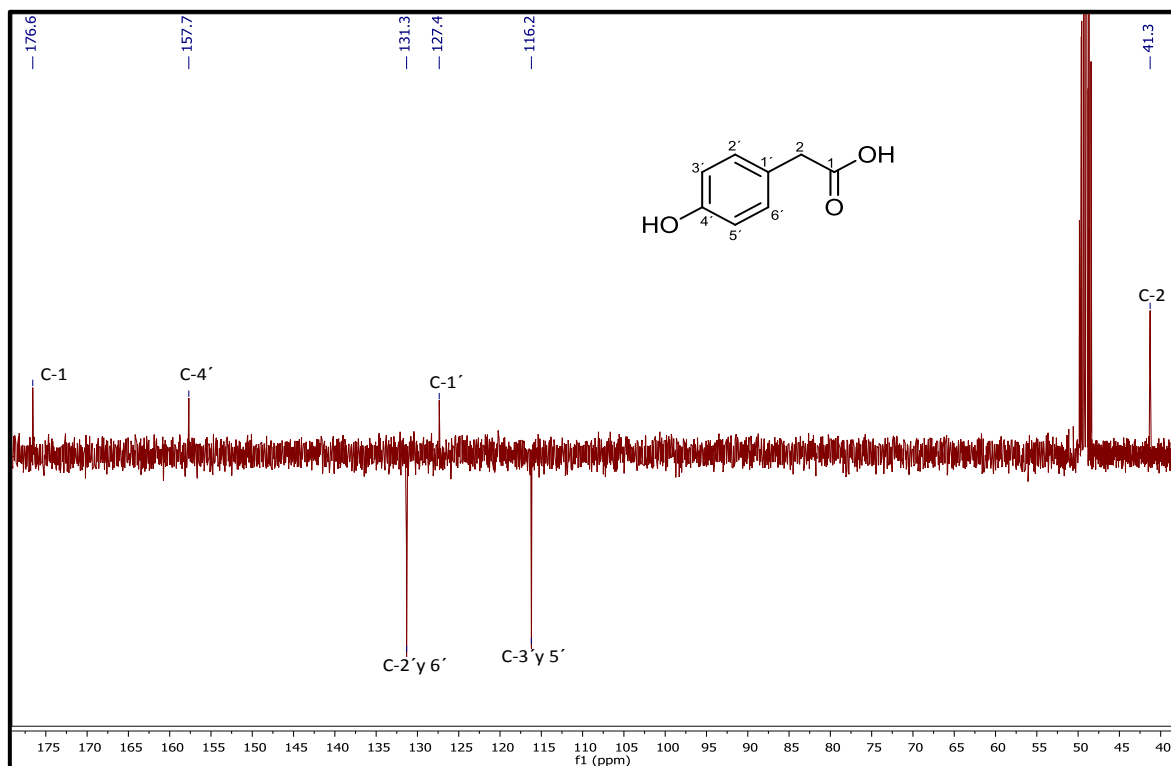
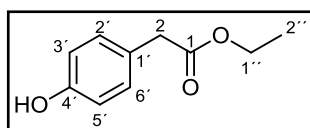


Figura 3-46. Espectro RMN ^{13}C de **Ácido *p*-hidroxifenilacético (Oc-11)** (75 MHz, CD_3OD).



***p*-hidroxifenilacetato de etilo (Oc-7):** Aceite amarillo. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3,52 (s, 2H, H-2), 7,11 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-2' y 6'), 6,77 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-3' y 5'), 4,13 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, H-1''), 1,24 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, H-2''). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 172,5 (C-1), 40,7 (C-2), 126,1 (C-1'), 130,5 (C-2' y 6'), 115,6 (C-3' y 5'), 155,1 (C-4'), 61,0 (C-1''), 14,3 (C-2''). MS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 181 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_3$ [125,126].

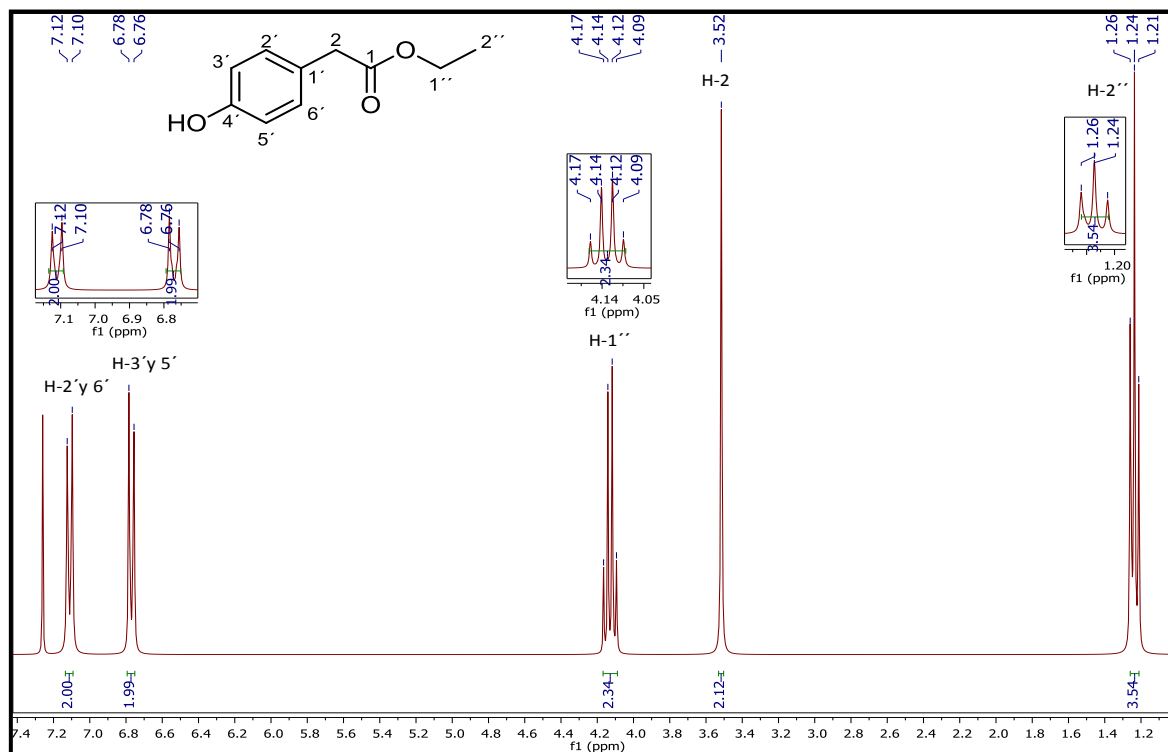


Figura 3-47. Espectro RMN ^1H de *p*-hidroxifenilacetato de etilo (Oc-7) (300 MHz, CDCl_3).

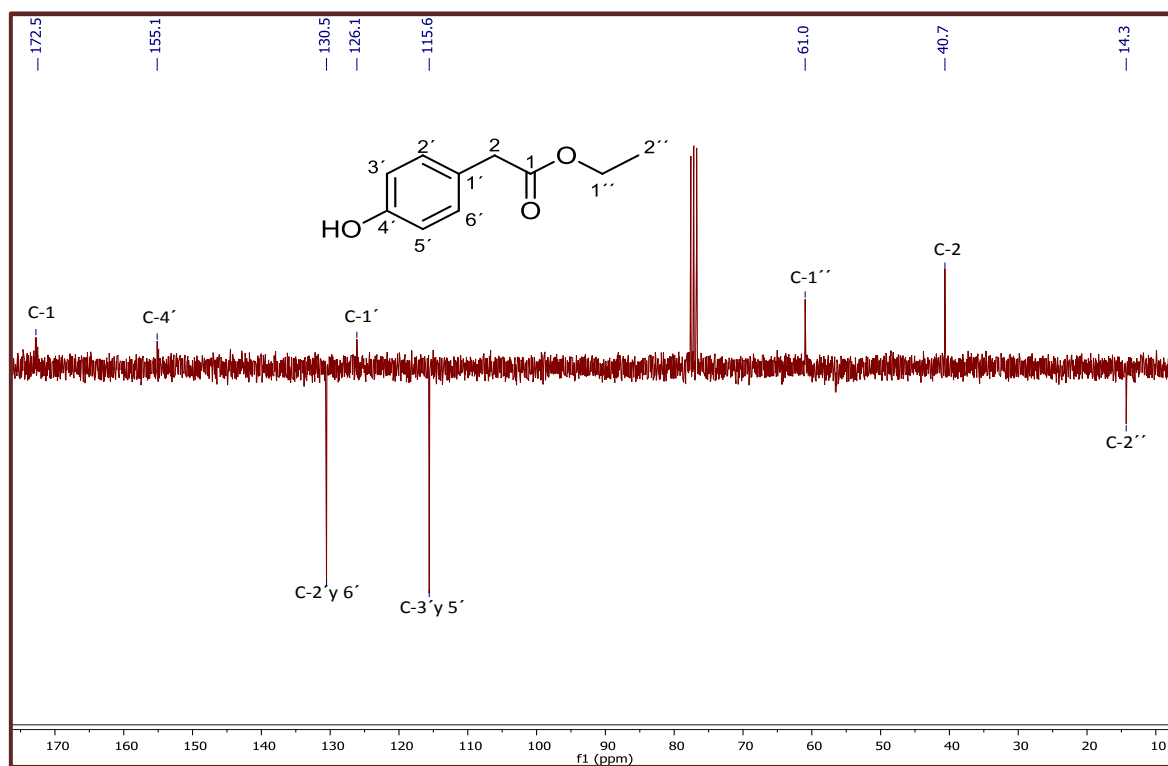
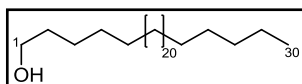


Figura 3-48. Espectro RMN ^{13}C de *p*-hidroxifenilacetato de etilo (Oc-7) (75 MHz, CDCl_3).

3.1.4 Datos espectroscópicos de los hidrocarburos y terpenos conocidos aislados de hojas de *O. caudata*.



1-Triacontanol (Oc-6): Sólido cristalino blanco. Punto de fusión 85 °C. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3,64 (t, $J = 6,61$ Hz, 2H, H-1), 1,58 (sa, 2H, H-2), 1,25 (sa, 54H, H-3 – 29), 0,87 (t, $J = 6,64$; Hz, 3H, H-30). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 63,3 (C-1), 33,0 (C-2), 25,9 (C-3), 29,5 (C-5), 29,8 (C-6 – 25), 29,6 (C-26), 29,8 (C-27), 32,1 (C-28), 22,9 (C-29), 14,3 (C-30). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 420 (5), 97 (82), 83 (79), 69 (66), 57 (100), 43 (70). $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ m/z 420.15 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{60}$ [127].

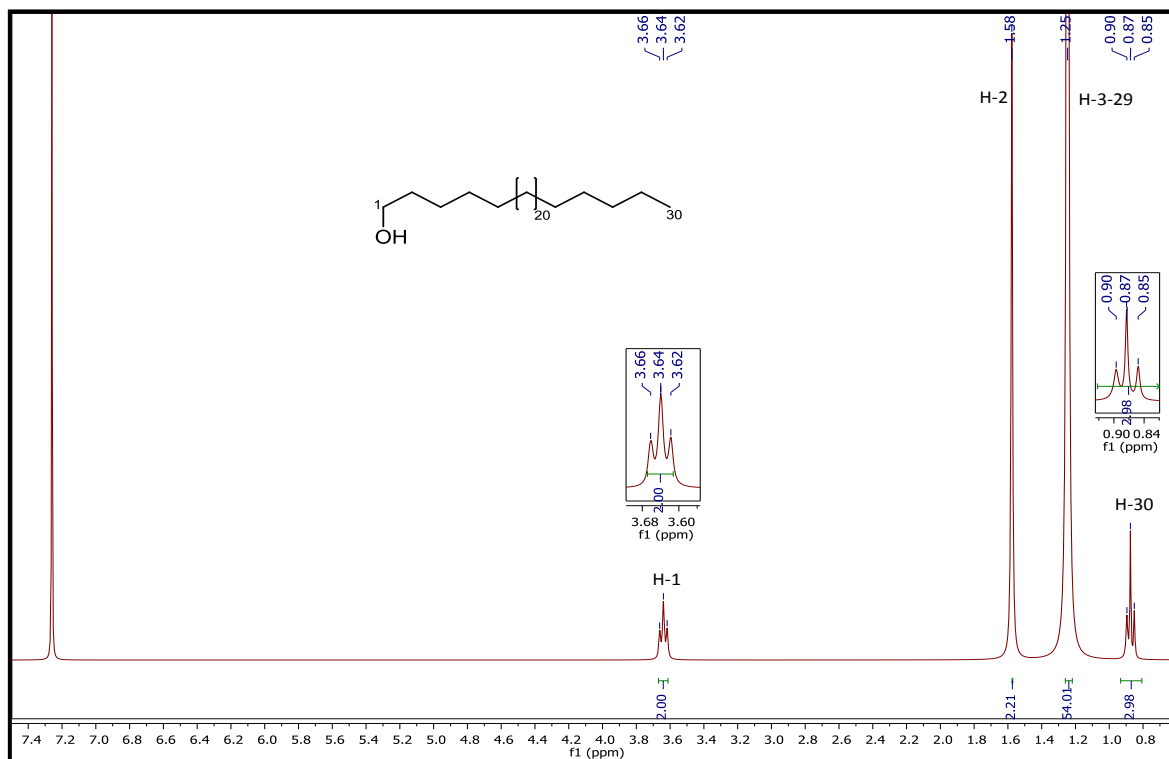


Figura 3-49. Espectro RMN ^1H de 1-Triacontanol (Oc-6) (300 MHz, CDCl_3).

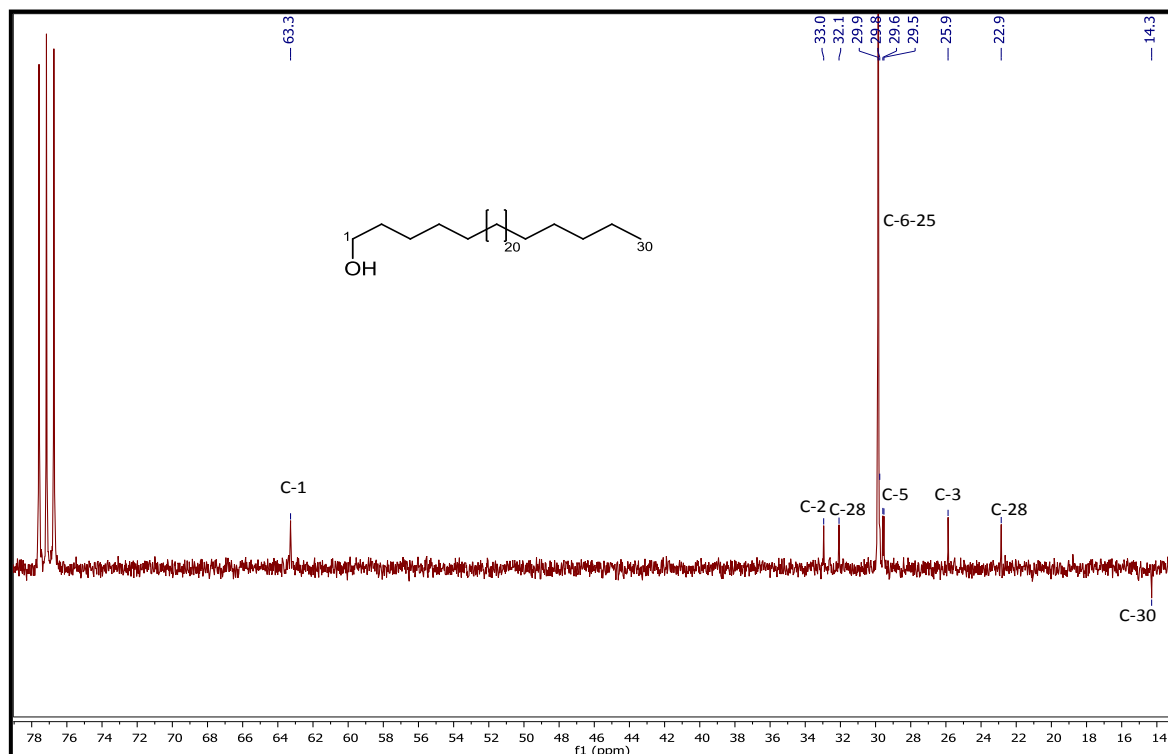
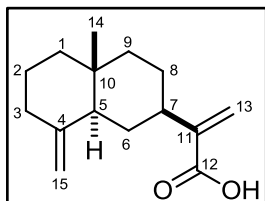


Figura 3-50. Espectro RMN ^{13}C de 1-Triacontanol (Oc-6) (75 MHz, CDCl_3).



Ácido cóstico (Oc-9): Sólido amarillo. Punto de fusión: 87 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +18.0 ° (c 0.017, CHCl_3). RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ_{H}

1,54 – 1,40 (m, 1H, Ha-1), 1,34 – 1,24 (m, 1H, Hb-1), 1,65 – 1,56 (m, 2H, H-2), 2,37 – 2,29 (m, 1H, Ha-3), 2,06 – 1,95 (m, 1H, Hb-

3), 1,92 (dd, $J = 11,9$; 2,7 Hz, 1H, H-5), 1,72 – 1,62 (m, 1H, Ha-6), 1,30 – 1,19 (m, 2H, Hb-6), 2,55 (tt, $J = 11,9$; 2,7 Hz, 1H, H-7), 1,71 – 1,61 (m, 1H, Ha-8), 1,52 – 1,39 (m, 1H, Hb-8), 1,56 – 1,47 (m, 1H, Ha-9), 1,37 – 1,22 (m, 1H, Hb-9), 6,34 (s, 1H, Ha-13), 5,71 (s, 1H, Hb-13), 0,76 (s, 3H, H-14), 4,72 (d, $J = 1,1$ Hz, 1H, Ha-15), 4,42 (d, $J = 1,1$ Hz, 1H, Hb-15). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} 41,9 (C-1), 23,5 (C-2), 36,9 (C-3), 150,8 (C-4), 49,9 (C-5), 30,0 (C-6), 39,4 (C-7), 27,4 (C-8), 41,1 (C-9), 36,0 (C-10), 145,3 (C-11), 172,7 (C-12), 125,1 (C-13), 16,5 (C-14), 105,6 (C-15). MS-ESI $[\text{M-H}]^+$ m/z 233 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_2$ [93].

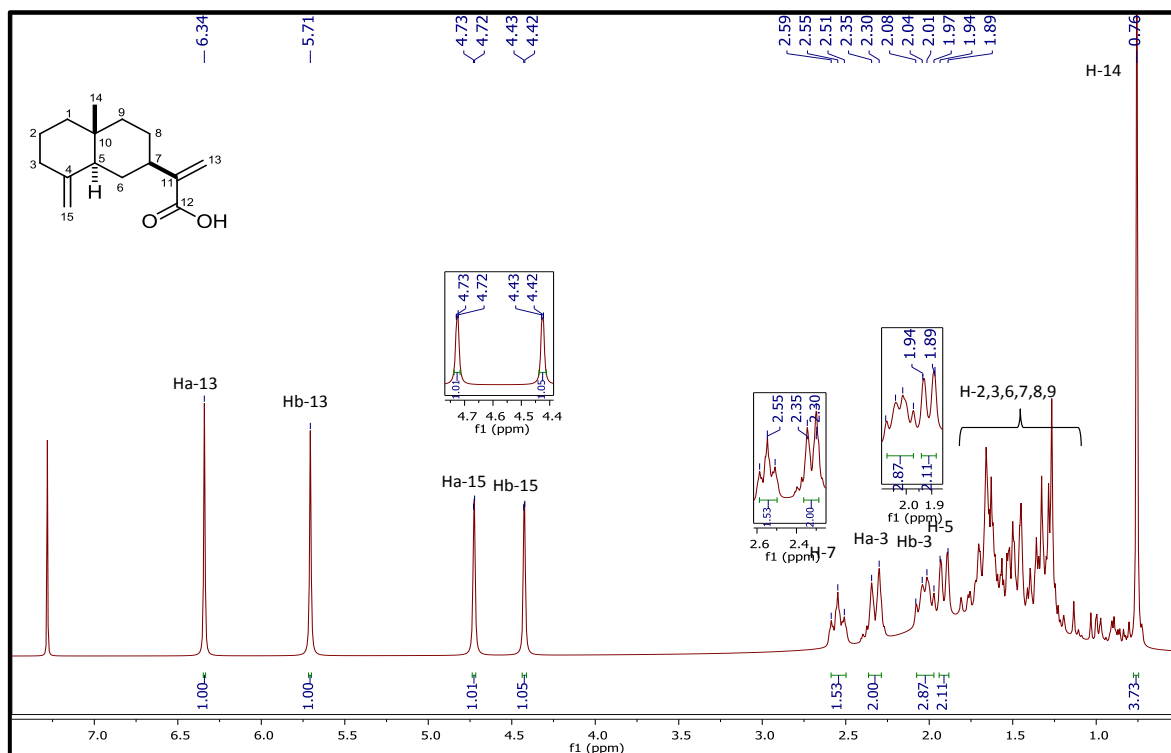


Figura 3-51. Espectro RMN ^1H de Ácido cóstico (Oc-9) (300 MHz, CDCl_3).

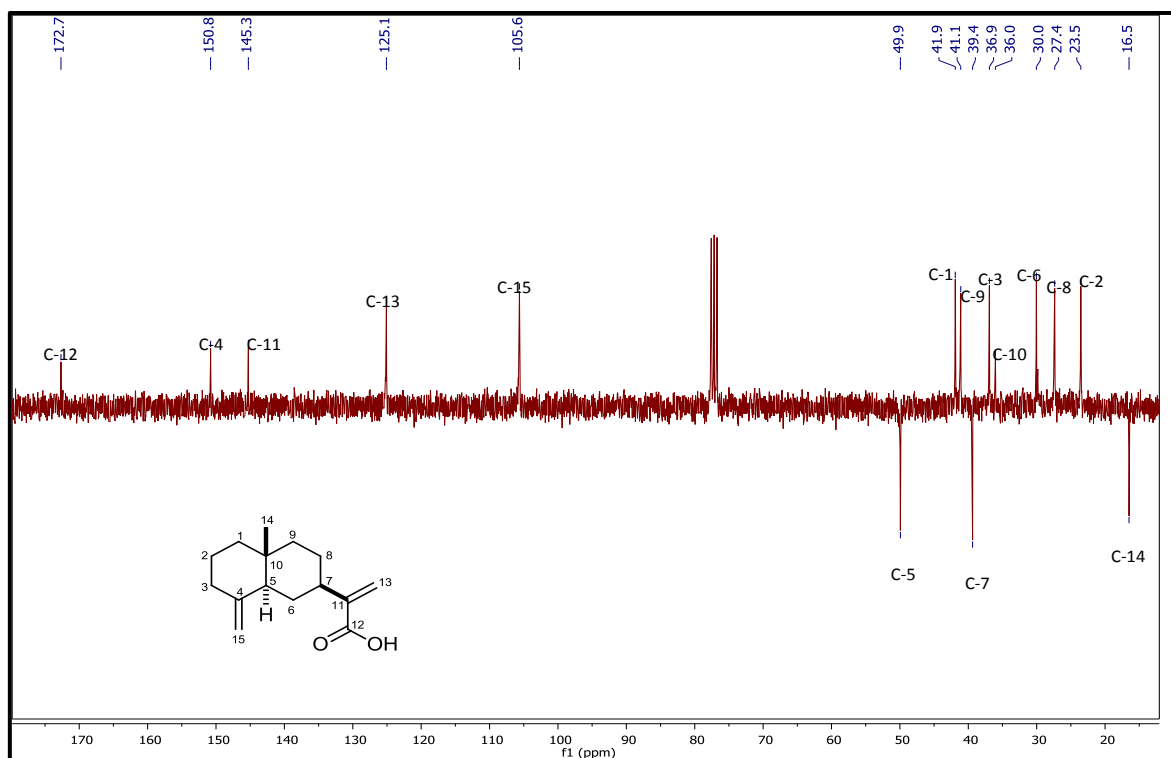
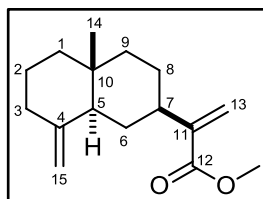


Figura 3-52. Espectro RMN ^{13}C de Ácido cóstico (Oc-9) (75 MHz, CDCl_3).



Éster metílico del ácido cóstico (Oc-8): Aceite amarillo. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 1,50 – 1,33 (m, 2H, H-1), 1,63 – 1,52 (m, 1H, H-2), 2,27 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, Ha-3), 1,97 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, Hb-3), 1,84 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H, H-5), 1,65 – 1,58 (m, 1H, Ha-6), 1,29 – 1,24 (m, 2H, Hb-6), 2,51 (t, $J = 11,0$ Hz, 1H, H-7), 1,64 – 1,58 (m, 1H, Ha-8), 1,47 – 1,38 (m, 1H, Hb-8), 1,53 – 1,47 (m, 1H, Ha-9), 1,38 – 1,30 (m, 1H, Hb-9), 6,12 (s, 1H, Ha-13), 5,54 (s, 1H, Hb-13), 0,70 (s, 3H, H-14), 4,67 (s, 1H, Ha-15), 4,37 (s, 1H, Hb-15), 3,72 (s, 3H, OCH_3). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} 41,8 (C-1), 23,5 (C-2), 36,8 (C-3), 150,7 (C-4), 49,8 (C-5), 30,0 (C-6), 39,6 (C-7), 27,3 (C-8), 41,0 (C-9), 36,0 (C-10), 145,9 (C-11), 168,0 (C-12), 122,6 (C-13), 16,4 (C-14), 105,5 (C-15), 51,9 (OCH_3). MS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 249 corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_2$ [128].

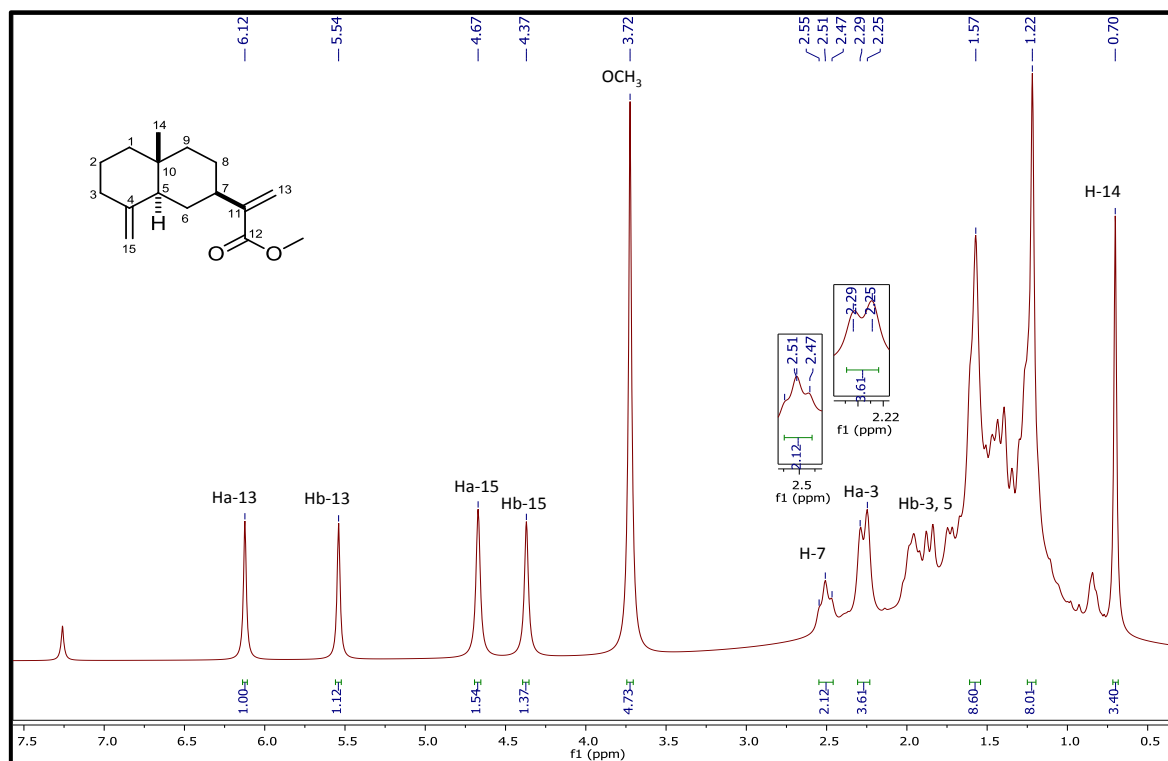


Figura 3-53. Espectro RMN ^1H de **Éster metílico del ácido cóstico (Oc-8)** (300 MHz, CDCl_3).

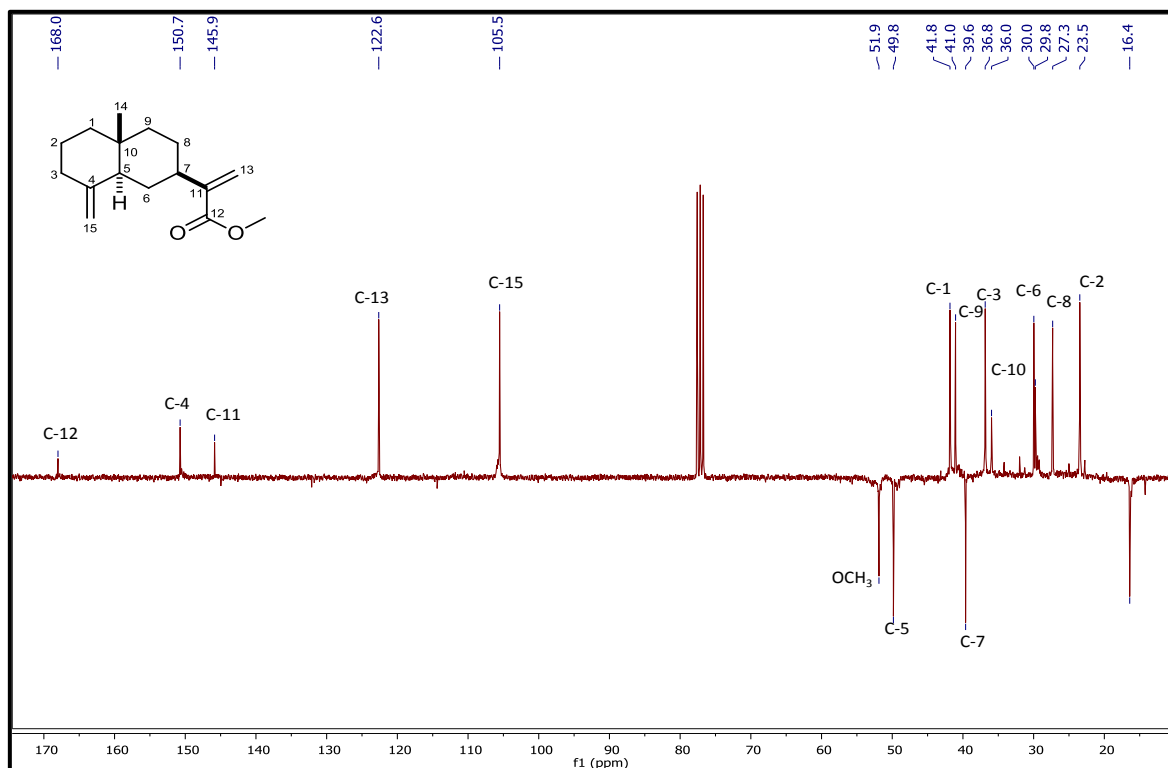
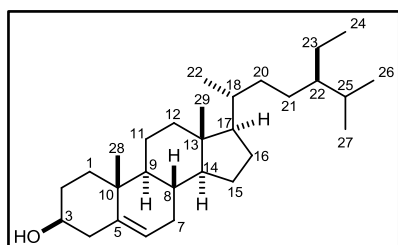


Figura 3-54. Espectro RMN ^{13}C de Éster metílico del ácido cóstico (Oc-8) (75 MHz, CDCl_3).



β -Sitosterol (Oc-5): Sólido blanco. Punto de fusión: 135 °C. EM [IE, 70 eV] m/z (%): 414 (78), 107 (46), 57 (52), 55 (58), 43 (100). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 3,52 (tdd, 1H, $J = 11,05$; 11,05; 5,3; 4,5 Hz, H-3), 5,34 (dt, 1H, $J = 6,4$; 2,0; 2,0 Hz, H-5), 0,82 (s, 3H, H-19), 0,83 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H, H-24), 0,84 (s, 3H, H-26), 0,81 (s, 3H, H-27), 0,69 (s, 3H, H-28), 1,01 (s, 3H, H-29) [129].

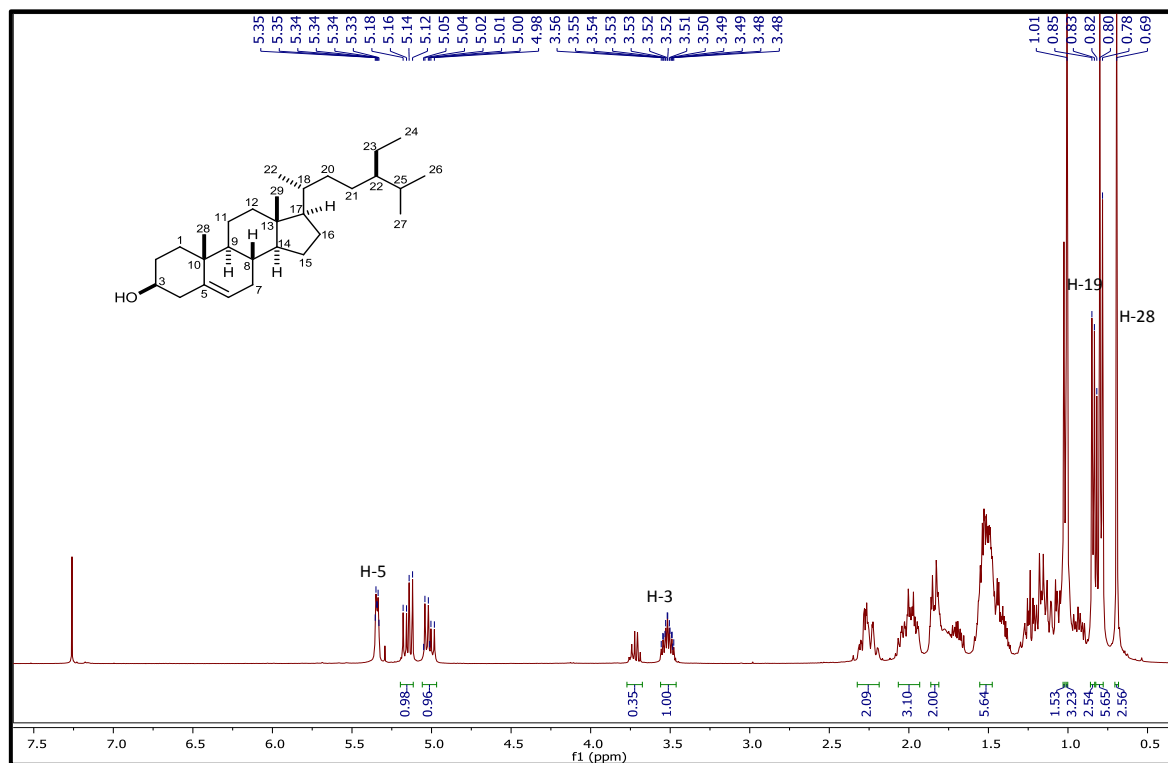


Figura 3-55. Espectro RMN ^1H de β -Sitosterol (**Oc-5**) (300 MHz, CDCl_3).

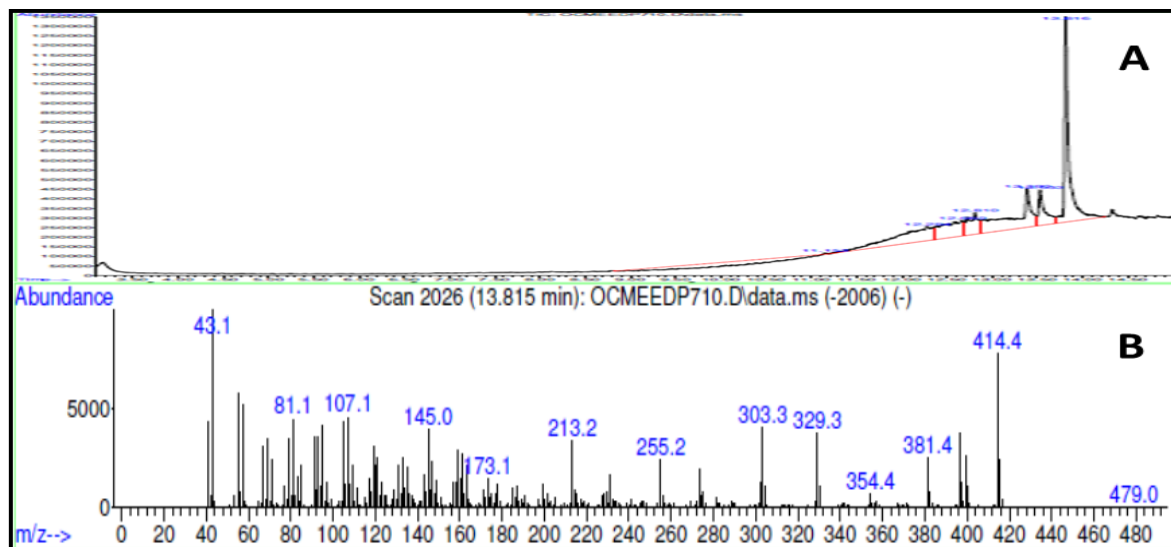


Figura 3-56. TIC y espectro de masas del β -Sitosterol (**Oc-5**). **A.** TIC donde se destaca el pico a 13.815 min del **Oc-5**. **B.** Espectro de masas con la fragmentación típica de **Oc-5**.

Mezcla de ácido palmítico (Oc-1) y ácido linoleico(Oc-2):

Ácido palmítico (**Oc-1**): 8.12 min (IR 1962 [76]). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 256 (31) [M^+], 73 (100), 60 (83), 57 (69), 43 (89), 41 (69).

Ácido linoleico (**Oc-2**): 8.94 min (IR 2144 [76]). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 280 (12) [M^+], 95 (54), 81 (79), 67 (100), 55 (88), 41 (80).

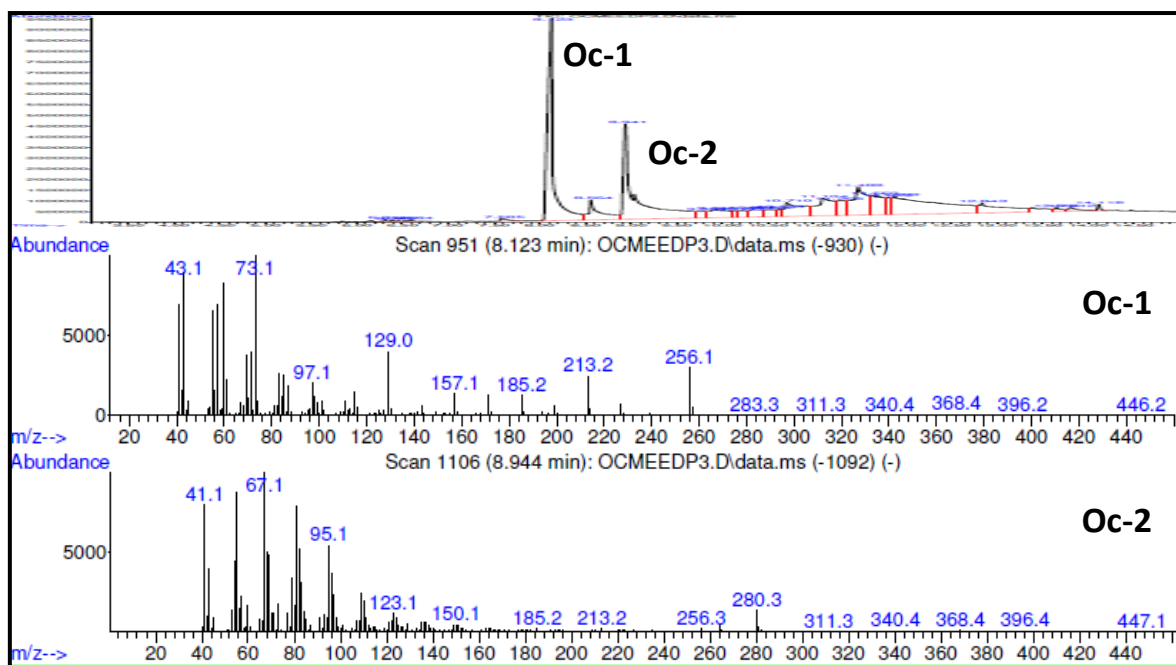


Figura 3-57. TIC y espectros de masas de la mezcla de **Oc-1** y **Oc-2**.

Mezcla de esteroides (Oc-3 - Oc-5):

Campesterol (Oc-3): 16.95 min (IR 3310 [76]). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 400 (85) [M^+], 289 (48), 107 (50), 55 (56), 43 (100).

Estigmasterol (Oc-4): 17.31 min (IR 3336 [76]). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 412 (66) [M^+], 83 (69), 81 (61), 69 (55), 55 (100).

β -Sitosterol (Oc-5): 18.14 min (IR 3411 [76]). EM [IE, 70 eV] m/z (%): 414 (78), 107 (46), 57 (52), 55 (58), 43 (100).

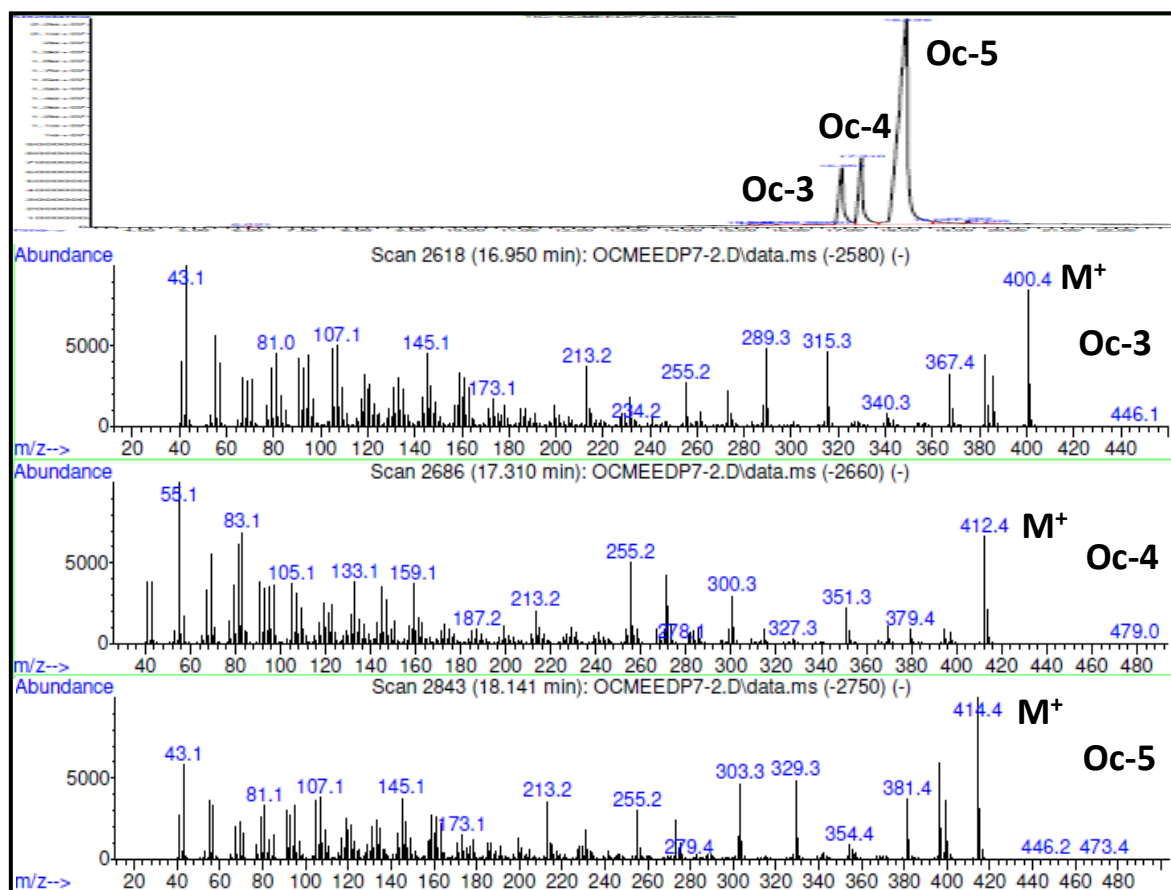


Figura 3-58. TIC y espectros de masas de la mezcla de **Oc-3**, **Oc-4** y **Oc-5**.

3.2 Estudio comparativo entre los diferentes órganos de *O. caudata* con base en la composición química.

El estudio fitoquímico comparativo de los extractos de los diferentes órganos de la especie objeto de estudio se llevó a cabo mediante la búsqueda de la presencia de los metabolitos aislados de las hojas en los demás extractos usando estrategias de derreplicación y la comparación de los extractos por el método estadístico de análisis multivariado.

3.2.1 Derreplicación de los compuestos aislados de las hojas en los extractos de corteza, madera, frutos, cáliz y flores.

La composición química de los órganos diferentes a las hojas se llevó a cabo mediante la comparación de los perfiles cromatográficos (HPLC-DAD y HPLC-MSESI) de los extractos etanólicos de las partes de la planta, tomando como referencia los metabolitos aislados de las hojas de *O. caudata*.

La comparación de los perfiles cromatográficos requiere estandarizar el método cromatográfico para obtener cromatogramas con la mejor resolución posible. El análisis de los extractos etanólicos de hojas, corteza, madera, flores, frutos y cáliz por HPLC-DAD (ver Figura 3-59) permitieron establecer relaciones en cuanto a los constituyentes químicos presentes en los órganos en comparación con la mezcla de metabolitos aislados de las hojas, de esta forma se observa que la corteza y la madera contienen compuestos de mayor polaridad, mientras que en los frutos, cáliz y flores la mayoría de sus compuestos son de baja polaridad.

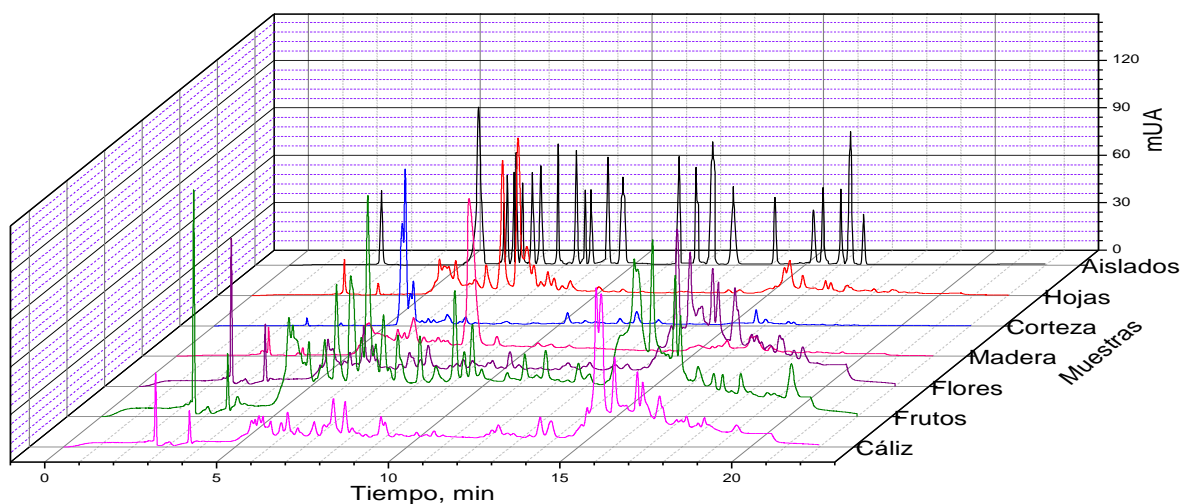


Figura 3-59. Perfiles cromatográficos de los metabolitos aislados y de los extractos hojas, corteza, madera, flores, frutos y cáliz a 270nm. Columna Sinergy C18 de 150 mm x 4.6mm, 5µm.

Para la derreplicación se determinó la masa molecular de los metabolitos aislados y la posible masa molecular de todos los picos cromatográficos obtenidos en los extractos.

De esta forma se comparó la masa molecular, el patrón de fragmentación y el espectro ultravioleta de los metabolitos aislados con los correspondientes a cada pico cromatográfico de los extractos de los órganos de la planta.

Al comparar los perfiles de las hojas y de los metabolitos obtenidos se aprecia que se aislaron la mayoría de los componentes de polaridad media presentes en el extracto de hojas (ver Figura 3-60).

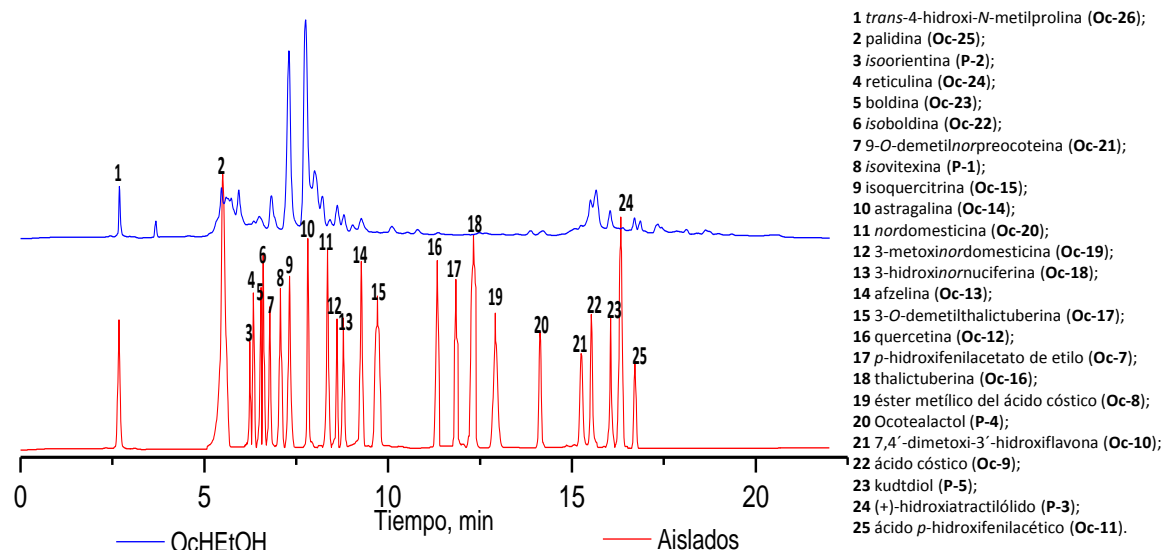


Figura 3-60. Perfiles cromatográficos de los metabolitos aislados y de los extractos de hojas (OcHEtOH) a 270nm. Columna Sinergy C18 de 150 mm x 4.6mm, 5µm.

Comparando los seis extractos, se aprecian similitudes entre ellos, encontrándose que en los extractos de corteza y madera se observaron menor número de los compuestos aislados; 15 para la corteza y 12 para la madera (ver Figura 3-61), mientras que en los extractos de flores, frutos y cáliz (ver Figura 3-62) se aprecian la mayoría de ellos: 21 para las flores, 18 para los frutos y 20 para el cáliz.

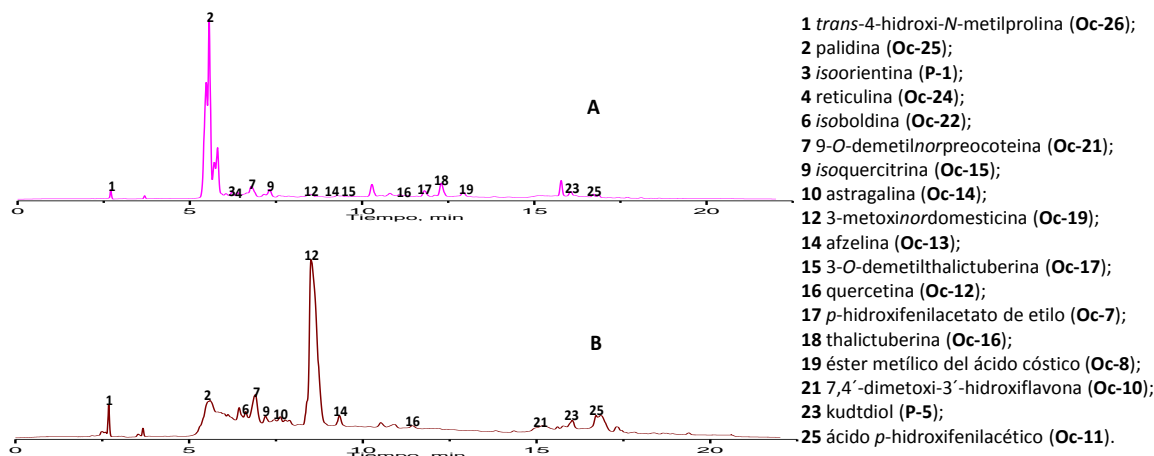


Figura 3-61. Perfiles cromatográficos de los extractos de A) corteza (OcCEtOH) y B) madera (OcMEtOH) a 270nm. Columna Sinergy C18 de 150 mm x 4.6mm, 5µm.

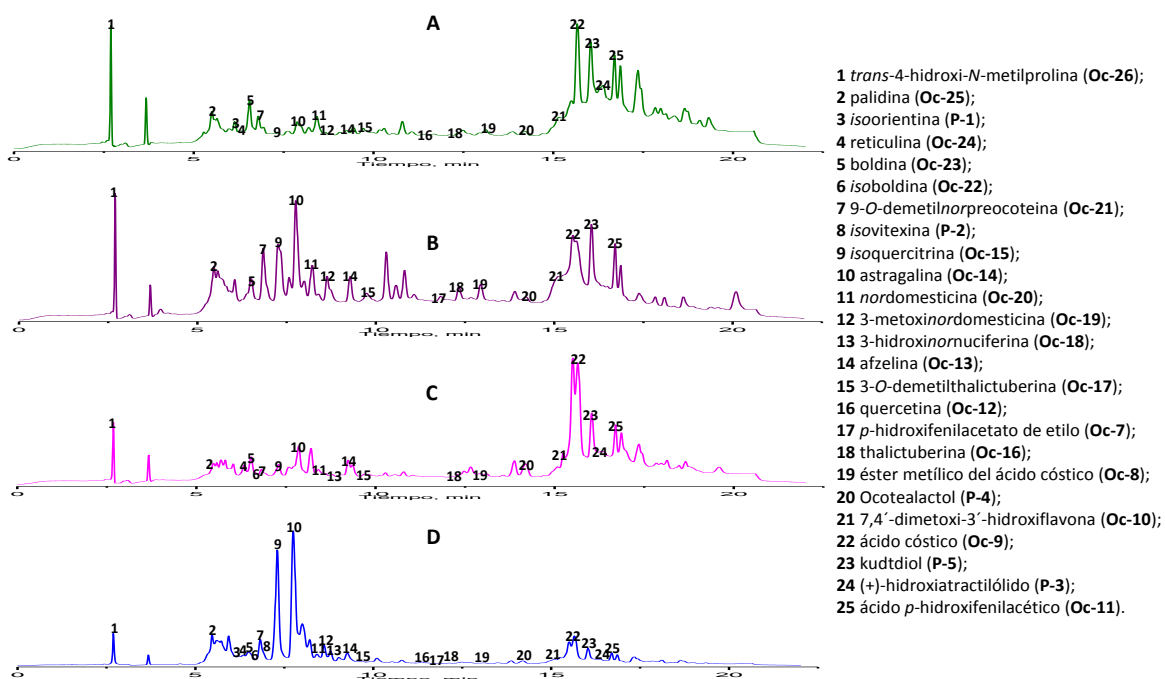


Figura 3-62. Perfiles cromatográficos de los extractos de A. Flores (OcFIEtOH), B. Frutos (OcFrEtOH), C. Cáliz (OcCálizEtOH) y D. Hojas (OcHEtOH) a 270nm. Columna Sinergy C18 de 150 mm x 4.6mm, 5µm.

Es de anotar que en todos los extractos se encuentran en común siete compuestos en diferentes proporciones para cada uno así: *trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**), la palidina (**Oc-25**), 9-*O*-demetilnorpreocoteina (**Oc-21**), la isoquercitrina (**Oc-15**), la

astragalina (**Oc-14**), la 3-metoxinordomesticina (**Oc-19**), la afzelina (**Oc-13**), (+)-hidroxiatractilólido (**P-3**), Ocotealactol (**P-4**); kudtdiol (**P-5**) y el ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**). La madera y las hojas tienen en común nueve compuestos: *trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**), palidina (**Oc-25**), 9-*O*-demetilnorpreocoteina (**Oc-21**), isoquercitrina (**Oc-15**), 3-metoxinordomesticina (**Oc-19**), afzelina (**Oc-13**), quercetina (**Oc-12**), kudtdiol (**P-5**), ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**) y en las hojas, flores, frutos y cáliz 17 compuestos: *trans*-4-hidroxi-*N*-metilprolina (**Oc-26**), palidina (**Oc-25**), boldina (**Oc-23**), 9-*O*-demetilnorpreocoteina (**Oc-21**), isoquercitrina (**Oc-15**), astragalina (**Oc-14**), nordomesticina (**Oc-20**), 3-metoxinordomesticina (**Oc-19**), afzelina (**Oc-13**), 3-*O*-demetilthalictuberina (**Oc-17**), thalictuberina (**Oc-16**), éster metílico del ácido cóstico (**Oc-8**), Ocotealactol (**P-4**); 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona (**Oc-10**), ácido cóstico (**Oc-9**), kudtdiol (**P-5**), ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**).

3.2.2 Comparación de los extractos de los órganos de *O. caudata* por análisis multivariado.

Además del procedimiento de derreplicación, se realizó la comparación de los extractos mediante el análisis estadístico multivariado integrando toda la información que se obtiene del HPLC-DAD y del HPLC-MSEI. El estudio de comparación mediante el método multivariado corresponde a un análisis de componentes principales (PCA) y análisis de conglomerados jerárquico (HCA), en el cual se incluyeron todos los datos generados (3900 variables) para así encontrar semejanzas entre los extractos respecto a su composición (PCA) y facilitar la visualización por agrupaciones de acuerdo con las similitudes de las muestras (HCA).

La ejecución del algoritmo de PCA sobre los seis extractos de *O. caudata* generó la gráfica de *scores* de la Figura 3-63, donde se correlacionan las tres componentes principales que explican el 79 % de la varianza total. En el diagrama se observan tres grupos principales; uno constituido por los extractos de hojas, flores, cáliz y frutos; otro grupo constituido por el extracto de corteza y el tercero integrado por el extracto de madera. Estos resultados indican un comportamiento homogéneo en la composición de *O. caudata*, la cual se mantiene más estrechamente relacionada entre las hojas, flores,

cáliz y frutos, mientras que en la corteza y madera se encuentran las mayores variaciones.

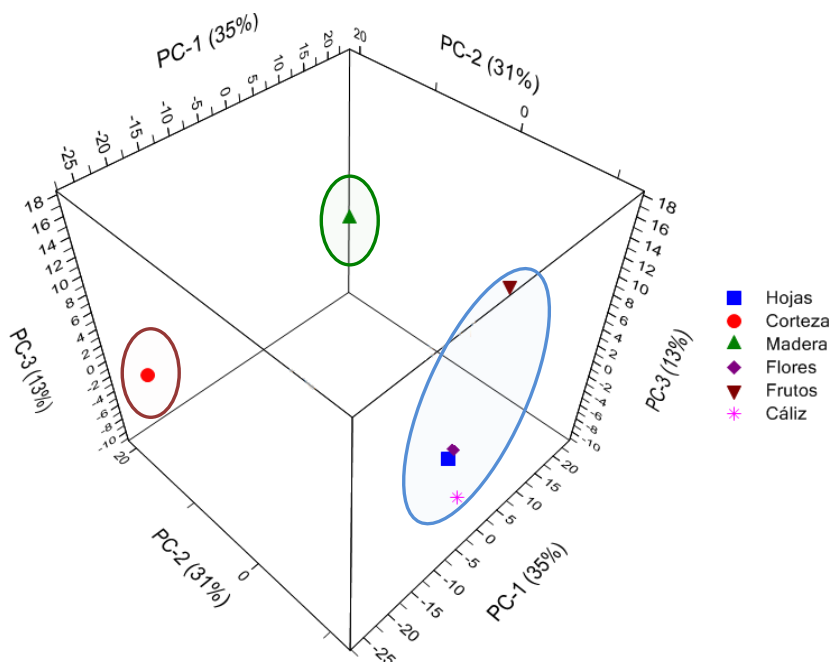


Figura 3-63. Diagrama de scores del PCA 3D para los extractos de hojas, flores, cáliz, frutos, corteza y madera.

Para confirmar las diferencias o semejanzas encontradas en el análisis de PCA, se realizó el análisis de clústeres o análisis de conglomerados jerárquico (HCA). La Figura 3-64 muestra las agrupaciones constituidas en forma de dendogramas, en la que se aprecia una primera división del dendograma a partir de la cual se forman dos grupos; en el primero se encuentra el extracto de corteza y en el grupo dos el resto de extractos; esta separación inicial corrobora los resultados expuestos anteriormente en la cual la corteza presenta la composición química que menos se relaciona con los extractos. Finalmente, siguiendo con el análisis de clústeres se evidenció en las divisiones posteriores que los extractos de hojas, flores, cáliz y frutos presentan perfiles de composición química similares entre sí y diferentes a la corteza y madera.

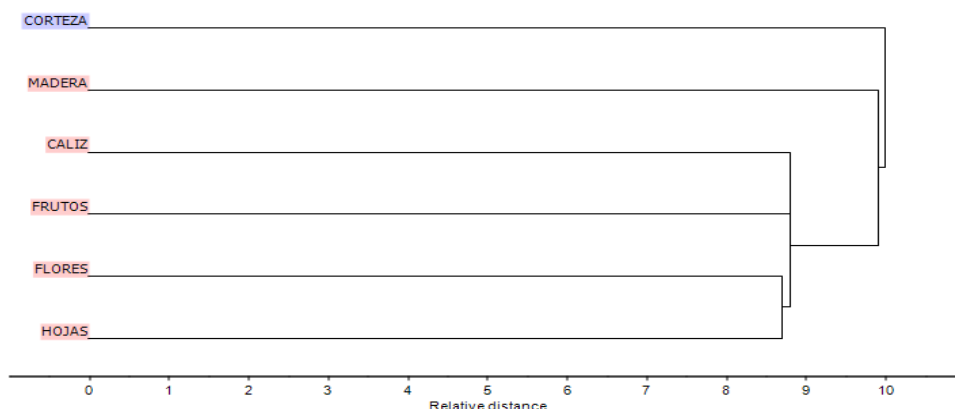


Figura 3-64. Dendrograma para los extractos de corteza, madera, frutos, cáliz, flores y hojas.

3.3 Composición química de los aceites esenciales

El género *Ocotea* es polifilético [6] lo cual permite que se presenten confusiones a la hora de su determinación botánica. Tal es el caso de la especie objeto del presente estudio de la que existe información confusa en literaturas grises (ver por ejemplo, <http://www.rainbowluna.co.uk/PBSCProduct.asp?itmID=10538486#.VglSJ-JOHAK>), donde se refiere al estudio del aceite esencial de *O. caudata* mostrando la especie como sinónimo de la *Aniba roseadora*, tradicionalmente conocida como palo de rosa. A pesar de que ambas especies pertenecen a la misma familia (Lauraceae) corresponden a géneros completamente diferentes. El presente trabajo demuestra que la composición química del aceite esencial de las hojas de *O. caudata* es totalmente disímil a la composición ampliamente reportada para el aceite de palo de rosa contribuyendo a una diferenciación real de las dos especies.

El resultado del análisis por GC-MS del aceite esencial de las hojas de *O. caudata* se presenta en la Tabla 3-3 según su orden de elución en la columna RTX-5 (ver figura 3-65), los índices de retención (IR) y cantidades relativas de cada componente. Se identificaron 37 sustancias que representan el 92.7 % del total de los componentes del aceite. De acuerdo con la Tabla 3-3 los sesquiterpenos son los componentes más abundantes en el aceite, representando el 83.7 %, siendo el germacreno D (55.8 %), el

biciclogermacreno (8.0 %), el β -cariofileno (4.6 %) y el β -bourboneno (2.3 %) los metabolitos que se encuentran en mayor cantidad.

Tabla 3-3. Principales componentes del aceite esencial de hojas de *O. caudata*.

Compuesto	Contenido aproximado en el aceite esencial, %	IR
Hidrocarburos 0.1%		
Heptano	0.1	700
Monoterpenos 1.6%		
α -Pino	0.2	940
Canfeno	0.1	956
Sabineno	<i>tr</i>	979
β -Pino	<i>tr</i>	985
β -Mirceno	<i>tr</i>	992
Limoneno	0.1	1026
<i>cis</i> - β -Ocimeno	1.2	1040
α -Terpinoleno	<i>tr</i>	1091
Fenol 0.1%		
Timol	0.1	1295
Sesquiterpenos 83.7%		
δ -Elemeno	1.8	1347
α -Cubebeno	0.1	1359
α -Ylangeno	0.4	1383
β -Cubebeno	1.2	1388
β-Bourboneno	2.3	1391
α -Gurjuneno	0.6	1414
<i>cis</i>-β-Cariofileno	4.6	1420
Calareno	0.3	1428
Aromadendreno	0.9	1432
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1.6	1437
α -Humuleno	0.5	1464
γ -Muroleno	0.3	1482
γ -Amorfenol	1.0	1487
Germacreno D	55.8	1490
(<i>trans</i> , <i>trans</i>)- α -Farneseno	1.6	1508
Biciclogermacreno	8.0	1509
γ -Cadineno	0.4	1519
α -Amorfenol	0.4	1527
δ -Cadineno	1.2	1530
Germacreno B	0.7	1565
Sesquiterpenos oxigenados 7.2%		
Elemol	0.2	1557
<i>trans</i> -Nerolidol	1.1	1563
1 α ,10 α -epoxi-Amorf-4-eno	1.9	1583
Espatuleno	0.3	1585
Epóxido de Humuleno II	0.4	1604
α -Cadinol	0.7	1653
α -Bisabolol	2.6	1692

IR: Índice de retención (n-alcanos C₇-C₂₄) compuestos listados en el orden de elución de la columna RTX-5, *tr* = trazas (contenido aproximado < 0.1%).

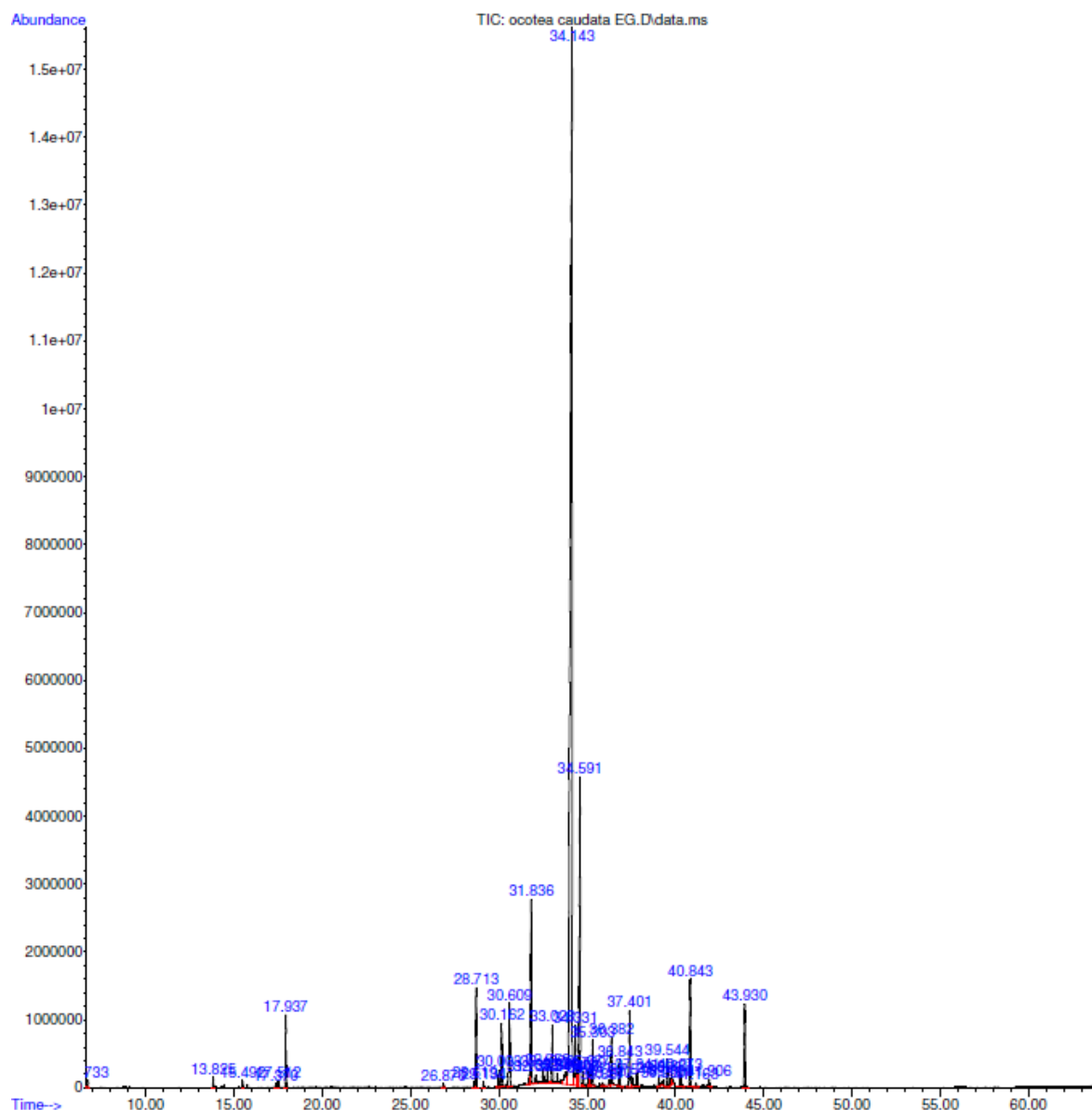


Figura 3-65. TIC del aceite esencial de hojas de *O. caudata*, columna RT-X5MS (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).

El compuesto más abundante en el aceite esencial de hojas de *O. caudata* es el germacreno D (55.8 %), el cual se encuentra ampliamente distribuido en las plantas no solo angiospermas, gimnospermas sino también en las briofitas y su función biológica aún no ha sido bien establecida [130]. No obstante, Setzer [131] afirma que los aceites esenciales que contienen altas concentraciones de germacreno D, normalmente contienen proporciones menores de cadinano y sesquiterpenoides de tipo muurolano.

Por lo tanto, se ha propuesto que el germacreno D es un precursor biogenético de algunos sesquiterpenoides como cadinano, muurolano y amorfano vía ciclación catalizada por ácidos, y es posible que estos reordenamientos puedan ocurrir durante la obtención del aceite esencial [130,131]. Lo anterior se puede observar en la composición de algunos aceites esenciales, por ejemplo, algunas especies de *Ocotea* presentan altas concentraciones de germacreno D seguido por trazas de γ -muuroleno, α -muuroleno, γ -cadineno, δ -cadineno, cadina-1,4-dieno, and α -cadineno [131]. En el presente estudio, en el aceite esencial de *O. caudata* se encontraron este tipo de sesquiterpenos con las siguientes proporciones: germacreno D (55.8 %), γ -muuroleno (0.3 %), γ -cadinene (0.4 %), δ -cadineno (1.2 %), α -amorfeno (0.4 %) y 1 α ,10 α -epoxi-Amorf-4-eno (1.9 %), lo cual corrobora lo expuesto anteriormente. En cuanto a la actividad biológica, el germacreno D ha presentado actividad antialimentaria contra herbívoros, actividad insecticida contra mosquitos, actividad repelente contra áfidos y garrapatas [130] y actividad antimicrobiana [132].

De otra parte, investigaciones sobre aceites esenciales de especies de *Ocotea* provenientes de Sur América y África mostraron variabilidad en su composición química permitiendo clasificarlos en dos grupos; el primero relacionado con aquellos aceites que presentan en su composición principalmente terpenos, y el segundo los aceites que contienen además de terpenos compuestos de tipo fenilpropanoide o derivados bencenoides [133]. En cuanto al primer grupo, los terpenos más comúnmente encontrados, ya sean en altas o en bajas concentraciones, son: α -pineno, β -pineno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno D, γ -cadineno, δ -cadineno y α -cadinol [57]. Estos nueve terpenos también han sido encontrados en otros géneros de la familia como *Beilschmiedia*, *Cinnamomum*, *Laurus*, *Lindera*, *Nectandra*, y *Persea* y, además, también hacen parte de la composición del aceite esencial de *O. caudata*, especie objeto del presente estudio, lo cual indica la cercana relación quimiotaxonómica entre *O. caudata* y otras especies de *Ocotea* que pertenecen al primer grupo de diversidad química; es decir aquellas *Ocoteas* que contienen terpenos en su aceite esencial, lo cual es típico de aceites esenciales de algunas especies de *Ocotea* originarias de Sur América [58].

3.4 Composición química de la fracción lipídica de los frutos de *O. caudata*.

Los aceites y grasas son ingredientes esenciales e indispensables en la dieta humana y animal y son insumos para industrias como pinturas, jabones, cosméticos, textiles, productos farmacéuticos, etc. Por esta razón es importante investigar este potencial disponible en semillas aún no estudiadas para ser utilizadas para la extracción de ácidos grasos a escala comercial. En este sentido, algunas especies de la familia Lauraceae son conocidas por su alto contenido de aceites en sus semillas, siendo *O. caudata* una especie miembro de esta familia la hace idónea para su estudio en ácidos grasos.

La extracción con heptano de los frutos y cáliz produjo 15 g de fracción lipídica de frutos y 620 mg de fracción lipídica de cáliz ambos de color amarillo, correspondiente a un rendimiento del 54,9 % para los frutos y 44,3 % para el cáliz. El análisis por GC-MS de la fracción lipídica de frutos y de cáliz de *O. caudata* determinó la composición de los ácidos grasos metilados en la que predominan los ácidos grasos saturados en un 72,6 % y 83,1 % para el cáliz respectivamente, conteniendo una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en los frutos que en el cáliz. La composición de los ácidos grasos en frutos y cáliz de *O. caudata*, obtenida por GC-MS y GC-FID, se muestra en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4. Composición de los ácidos grasos de frutos y cáliz de *O. caudata*.

Ácido graso		Composición de la fracción lipídica, % y mg/L							
		Frutos				Cáliz			
		Saturado		Insaturado		Saturado		Insaturado	
		%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L	%	mg/L
Ácido Láurico	C12:0	51,7	8377,9	-	-	64,4	8964,8	-	-
Ácido Mirístico	C14:0	2,3	324,4	-	-	3,1	442,7	-	-
Ácido Palmítico	C16:0	16,6	1571,7	-	-	15,6	2536,4	-	-
Ácido Esteárico	C18:0	2,0	300,1	-	-	-	-	-	-
Ácido oleico	C18:1	-	-	23,6	2791,1	-	-	16,9	2563,3
Ácido linoleico	C18:2	-	-	3,8	515,8	-	-	-	-
Total		72,6		27,6		83,1		16,9	

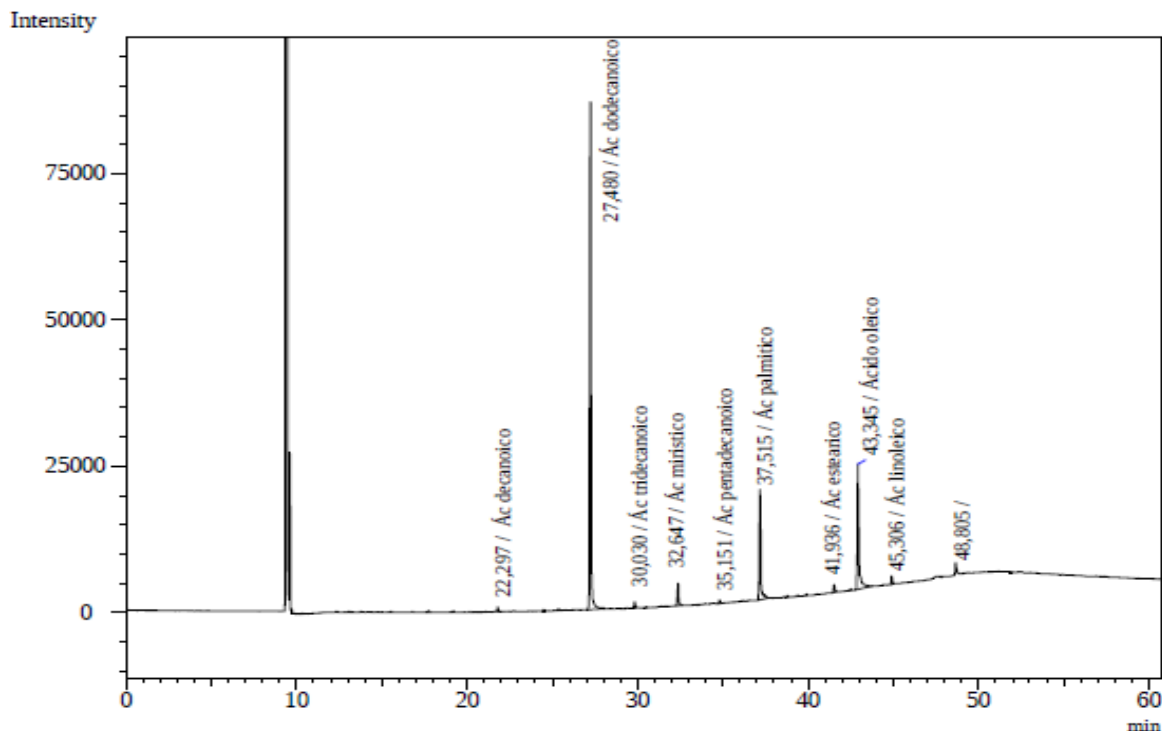


Figura 3-66. Cromatograma de los ácidos grasos de los frutos por GC-FID, columna RT-2560 (100 m x 250 μ m x 0.2 μ m).

La composición de ácidos grasos puede ayudar a la clasificación de las especies de Lauraceae. De acuerdo con estudios previos [134,135], existen tres tipos de aceites en sus semillas en los que se pueden agrupar algunas especies de Lauraceae: El primero aglomera especies que contienen ácidos grasos saturados de 10 y 12 carbonos, a este pertenece *Lindera benzoin*, *L. praeox*, *C. camphora* y *U. californica*; en el segundo se ubican aquellas especies que contienen ácidos grasos saturados de cadena media (C_{12}) e insaturados de cadena larga (C_{18}) como *Laurus nobilis*; y en el tercer grupo las Lauráceas que contengan ácidos grasos saturados e insaturados de cadena media (C_{10} – C_{14}) como *Lindera umbellata*. La *O. caudata* se ubica en el segundo grupo debido al contenido de ácido láurico (51,7 %, 8377,9 mg/L, C_{12}) y ácido oleico (23,6 %, 2791,1 mg/L, $C_{18:2}$) en sus frutos.

Estudios de ácido grasos en semillas de especies de la familia Lauraceae destacan el alto contenido de ácido láurico presente en ellas; de hecho el nombre común dado a este ácido se debe a que ha sido frecuentemente encontrado en semillas de la familia

[134,135,136]. Tal es el caso de los frutos y cáliz de *O. caudata* en los que el ácido graso más abundante es el ácido láurico con más del 50% del total de la composición de ácidos grasos en la fracción lipídica. Se considera que el contenido de ácido láurico es alto cuando se compara con el aceite de coco, el cual lo contiene en un 50% aproximadamente. Este alto contenido de ácido láurico sugiere que podría ser un producto muy valorado en la industria de los cosméticos, detergentes, jabones y en la industria alimenticia para la fabricación de alimentos a base de ácido láurico, incluso puede reemplazar algunos aceites de cocina. Todos estos factores hacen de la especie una fuente promisoría para su estudio y potencial utilización económica y comercial [137].

El índice de acidez de un aceite o grasa representa la cantidad (mg) de hidróxido de sodio necesaria para neutralizar los ácidos grasos libres de 1g de muestra de aceite. Para el caso de la fracción lipídica de frutos, el valor de acidez (tomando 2 g de muestra) fue de 14,6 mg NaOH/g fracción. La determinación de la acidez es un dato importante en la valoración del estado de conservación de un aceite, dado que valores altos significan que hay un proceso de descomposición con la subsecuente liberación de hidrogeniones; el valor obtenido para la fracción lipídica indica que el proceso de enranciamiento de los ácidos grasos aún no se ha presentado.

En cuanto al valor del índice de yodo, éste representa la medida de insaturación de los ácidos grasos que constituyen los aceites o grasas y se expresa como los gramos de I_2 fijados por 100 g de muestra. Tomando 0,21 g de fracción lipídica de frutos se obtuvo un valor de índice de yodo de 72,2 g I_2 /100 g de fracción. Este valor es más útil para la evaluación de grasas sólidas que de aceites por lo que en el caso de la fracción lipídica de frutos es más confiable el análisis de la composición química realizado por GC-MS y GC-FID.

De acuerdo con la composición de la fracción lipídica, hace atractiva su aplicación en la elaboración de emulsiones debido a que los ácidos grasos que contiene (ácido láurico, oleico y palmítico principalmente) son compatibles con los emulsionantes y demás componentes comúnmente empleados en las emulsiones; por ejemplo el ácido

esteárico, alcohol cetílico, lanolina, aceites minerales, sales de ácidos grasos y ceras o parafinas, entre otros [63].

3.4.1 Uso de la fracción lipídica en la elaboración de una emulsión.

Los ácidos grasos son considerados emolientes liposolubles que le proporcionan suavidad y sensación de bienestar a la piel. Los ácidos grasos y sus ésteres son emolientes de interés debido a sus propiedades físicas; en el caso de la fracción lipídica de los frutos ayudan a mejorar la consistencia de la emulsión gracias a que su punto de fusión es muy cercano a la temperatura del cuerpo [138]. Las propiedades de la emulsión elaborada se presentan a continuación.

- Características organolépticas de la emulsión:

Las características sensoriales brindan un primer acercamiento del producto al usuario y dan una idea de la calidad del producto fabricado y su aceptación por parte de los consumidores, una emulsión debe presentar un aspecto homogéneo, color y olor agradable y textura suave cuando se aplica en la piel.

Las características organolépticas de la emulsión elaborada son:

Aspecto:	Homogéneo, untuoso al tacto
Color:	Amarillo
Olor:	Amaderado.
Presencia de grumos:	Negativo
Untuosidad:	Penetrante, lipofílica

Las características organolépticas de la emulsión son aceptables de acuerdo con la normatividad de la USP 30, la emulsión presenta un aspecto homogéneo untuoso al tacto, el color amarillo es debido a la fracción de ácidos grasos agregados, no hay presencia de grumos y tiene una buena untuosidad lipofílica. Es de destacar el olor amaderado el cual le dió una apreciación bastante positiva al grupo de panelistas, este

olor es debido posiblemente a la presencia de terpenos, principalmente germacreno D que tiene una nota odorífera amaderada.

- **Determinación del pH de la emulsión**

pH (método potenciométrico): 6,75

El pH de la emulsión es cercano a 7,00, el pH se encuentra dentro de los límites permitidos para una emulsión que es en un rango entre 4 – 7 (USP 30). Teniendo en cuenta que el pH de la piel es 5,5 y que el pH obtenido no está muy lejano a este valor, existe una alta compatibilidad al aplicar el producto tópicamente, lo cual no constituye riesgos para la salud ya que no generará irritaciones en la piel.

- **Determinación de extensibilidad de la emulsión**

Extensibilidad (cm): 4,0

El valor de extensibilidad se encuentra dentro de los límites permitidos en USP 30 que considera la extensibilidad hasta 5 cm. Este valor muestra que la emulsión presenta una buena distribución en la piel, untuosidad, absorción y se encuentra exenta de grumos.

- **Determinación de la viscosidad de la emulsión**

El valor de viscosidad de la emulsión fue de 182,61 cP, el cual se encuentra dentro de los límites establecidos por la USP 30 para un producto de las características reológicas para una emulsión.

- **Determinación de la termorresistencia de la emulsión**

La termorresistencia determina la estabilidad de la emulsión expuesta a diferentes temperaturas y durante máximo dos meses, transcurrido este tiempo el producto no debe evidenciar cambios en sus propiedades. En la Tabla 3-5 se aprecian las

características de la emulsión después de ser expuesta a 37 °C durante uno y dos meses.

Tabla 3-5. Exposición de la emulsión a 20 y 37 °C durante uno y dos meses.

Parámetros	20 °C	37 °C	
	Inicio	1 mes	2 meses
Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Color	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Olor	Agradable	Agradable	Agradable
pH	6,75	6,30	6,05
Untuosidad	Penetrante	Penetrante	Penetrante
Extensibilidad, cm	4,0	4,5	4,8
Presencia de grumos	Negativo	Negativo	Negativo
Viscosidad, cP	182,61	174,47	168,22

A 37 °C, los valores de viscosidad disminuyeron lo que indica que la extracción, la distribución y la manipulación se ven favorecidos con el aumento de la temperatura. Cuando los sistemas son inestables tienden a la separación de fases para alcanzar el equilibrio, por lo tanto valores de viscosidad altos significan que el sistema necesitará más energía para lograr que se formen grumos y por consiguiente la estabilidad será mayor. Se observa que después de cuatro semanas la viscosidad disminuyó pero aún no se observan grumos, es decir se mantiene su estabilidad. El pH presenta poca variación durante el tiempo indicando buena estabilidad de la emulsión y de los ácidos grasos en ella. Finalmente, se puede observar que los parámetros estudiados no presentaron mayor variación, por lo tanto se puede considerar la emulsión como estable.

- **Análisis microbiológico**

Análisis	Método	Resultado	Límite USP 30
Coliformes Totales	conteo de aerobios mesófilos totales en placa	Ausencia	< 10 UFC/ml
Aerobios Mesófilos	Método de recuento por dilución en tubo: NMP	Ausencia	< 10 UFC/ml

De acuerdo con los resultados no se observa crecimiento microbiológico en la emulsión lo cual indica que cumple con los parámetros de calidad establecidos por la farmacopea de los Estados Unidos (USP 30).

De acuerdo con las propiedades fisicoquímicas y sensoriales evaluadas para la emulsión elaborada se podría establecer, de manera preliminar, que los ácidos grasos presentes en los frutos de *O. caudata* se incorporan positivamente a la base emulsificante empleada, permitiendo utilizarlos como emolientes para la preparación de emulsiones, constituyendo un valor agregado en la prospección de la especie objeto de estudio. No obstante, la adquisición de los frutos es una limitante debido al número de ejemplares de la especie en el sitio de colecta y la producción anual de los mismos, en este sentido se recomienda emplear prácticas de propagación de la especie con el fin de obtener mayor cantidad de frutos y por ende más fracción lipídica que permita obtener una cantidad adecuada de la emulsión para su elaboración cumpliendo todas las etapas de un desarrollo de producto basado en QbD y su uso específico en aplicaciones dérmicas o capilares, por ejemplo.

3.5 Modificaciones químicas de la boldina

La modificación al grupo amino en la boldina se llevó a cabo vía degradación de Hofmann, obteniéndose derivados de la secoboldina. La preparación de los compuestos sintéticos implicó la *N*-alquilación de la boldina para producir la sal de aporfina cuaternaria y la posterior eliminación de Hofmann. Esta reacción se encuentra descrita por Liu y colaboradores [87] y Lee y colaboradores [88]. No obstante se evaluaron las condiciones propuestas y se cambiaron algunos parámetros como la base, tiempos, temperatura de reacción y disolvente para la obtención eficaz de los alcaloides fenantrénicos. En la Tabla 3-6 se encuentran las condiciones evaluadas para la *N*-alquilación de la boldina con bromuro de propargilo.

Tabla 3-6. Condiciones de reacción para la obtención de la *N*-propargilsecoboldina (**S-1**).

Entrada ^a	Disolvente	Base	T. °C	t. h	% Rend. de S-1
1	DMF	K ₂ CO ₃	130	1	7
2	DMF	<i>t</i> -BuOK	130	1	12
3	Acetona	K ₂ CO ₃	50	3	35
4	Acetona	<i>t</i> -BuOK	50	3	23
5	Acetona	K ₂ CO ₃	0 – <i>ta</i>	3	81
6	Acetona	<i>t</i> -BuOK	0 – <i>ta</i>	3	18

^a 1 eq Boldina **Oc-23**, 2 eq Base, 0,02 eq KI, disolvente, 2,2 eq Bromuro de propargilo.

Estos ensayos condujeron a la obtención de bajos rendimientos (entradas 1-4, Tabla 3-6) de **S-1**. Empleando K₂CO₃ con temperaturas de reacción desde 0 °C (entrada 5, Tabla 3-6) hasta temperatura ambiente (*ta*) se obtuvo la *N*-propargilsecoboldina, mientras que con el *t*-BuOK (entrada 6, Tabla 3-6) se obtuvieron dos productos *N*-alquilados: la *N*-propargilsecoboldina y la *N*-propargilboldina con bajos rendimientos. De este modo las mejores condiciones determinadas fueron las descritas en la entrada 5 de la Tabla 3-6 ya que se produjo el más alto rendimiento de **S-1**.

3.5.1 Discusión sobre la elucidación de los compuestos **S-1**, **S-2**, **S-3** y **S-4**.

Los espectros de RMN ¹H y ¹³C mostraron señales típicas de alcaloides fenantrénicos [139, 140]. El esquema para un núcleo fenantrénico se puede observar en la Figura 3-67.

Los alcaloides fenantrénicos aislados de la familia Lauraceae presentan oxigenación en el anillo A en los carbonos 3 y 4, mientras que en el anillo C las sustituciones se encuentran en los carbonos 6 y 7 y en el anillo B dos hidrógenos en posición *orto*.

El análisis estructural de los alcaloides fenantrénicos se caracteriza por presentar en RMN ¹H desplazamientos químicos en la región de los hidrógenos aromáticos, destacándose la señal para el hidrógeno sobre el C-5 que se aprecia a campo bajo y bastante separada de los otros protones aromáticos hacia δ_H 9,00. Los hidrógenos del anillo B en posición *orto* presentan dos señales dobletes características hacia δ_H 7,50 y 7,80 ($J = 9-10$ Hz) y los hidrógenos alifáticos de los carbonos 1' y 2' multipletes con

desplazamientos entre δ_H 2,00 - 4,00 que integra cada uno para dos hidrógenos [139, 140].

El espectro de masas muestra mayor información en cuanto a la naturaleza de las cadenas laterales. Las dos principales fragmentaciones corresponden a la pérdida del radical $\cdot CH_2NR_1R_2$ y cuando la ionización es fuerte se observa el catión $CH_2=N^+R_1R_2$ como el pico base [141].

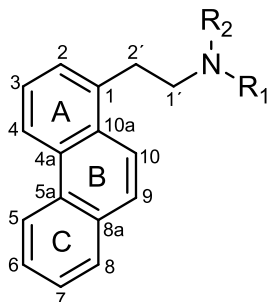


Figura 3-67. Esquema de un alcaloide fenantrénico

3.5.1.1 *N-propargilsecoboldina (S-1)*

Se obtuvo como un sólido amarillo, con punto de fusión 164 °C. El espectro de RMN 1H (ver Figura 3-68) presentó señales características de alcaloides fenantrénicos descritas anteriormente (ver numeral 3.5.1, página 110). En la región de los hidrógenos aromáticos en δ_H 8,94; 7,31 y 7,18 se observan tres singletes que integran cada uno para un hidrógeno y corresponden a los hidrógenos sobre los carbonos 5, 8 y 2 respectivamente y en δ_H 7,80 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H) y 7,50 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H) dos dobletes con constante de acoplamiento que indican la presencia de dos hidrógenos en posición *orto* correspondientes a los hidrógenos del anillo B (H-10 y H-9 respectivamente). En la región de los hidrógenos alifáticos se observan dos señales δ_H 2,81 (dd, $J = 9,8; 6,6$ Hz, 2H) y 3,21 (dd, $J = 9,9; 6,5$ Hz, 2H) correspondientes a los protones sobre el carbono 1' y 2' respectivamente [139, 140].

El espectro de RMN ^{13}C APT (ver Figura 3-69) permitió observar 22 señales correspondientes a 22 carbonos; tres metilenos, seis metinos, tres metilos y 10 cuaternarios. La conectividad entre los hidrógenos y sus respectivos carbonos fue

establecida por medio del experimento HSQC (ver Figura 3-70), tres carbonos metilénicos en δ_C 32,0; 56,9 y 45,6; seis carbonos metínicos, cinco de ellos unidos a anillo aromático en δ_C 124,4 y 121,3 (C-9 y 10); 116,6; 111,1 y 107,5 (C-5); un carbono metínico alifático en δ_C 73,6 correspondiente al carbono acetilénico. Finalmente dos metoxilos unidos a anillo aromático en δ_C 56,0 y 60,4 y un metilo unido a nitrógeno en δ_C 42,1 [139, 140].

En cuanto al grupo propargilo, el espectro RMN 1H (ver Figura 3-68) presenta una señal característica en δ_H 3,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H) correspondiente a los protones metilénicos que por su desplazamiento químico se encuentran sobre carbono unido a nitrógeno. En el experimento APT (ver Figura 3-69) se observa un carbono metínico alifático en δ_C 73,6 y un carbono metilénico en δ_C 45,6. En el experimento HSQC (ver Figura 3-70) el hidrógeno en δ_H 2,27 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H) presenta conectividad con el carbono δ_C 73,6 y los hidrógenos en δ_H 3,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H) con el carbono δ_C 45,6. El experimento HMBC (ver Figura 3-71) muestra correlaciones a tres y dos enlaces entre los hidrógenos metilénicos en δ_H 3,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H) con los carbonos en δ_C 73,6 y 78,5 [139, 140].

Mediante el experimento HMBC (Figura 3-71) se realizó la ubicación de los sustituyentes y la asignación de los carbonos cuaternarios. De este modo, por ejemplo, se confirmó la unión de la cadena lateral del alcaloide (C-2') al anillo fenantrénico (C-1) por las correlaciones observadas a tres enlaces entre el hidrogeno del anillo aromático δ_H 7,18 (s, 1H, H-2) con el carbono alifático en δ_C 32,0 (C-2'). De esta forma también se pudo corroborar la unión del grupo propargilo al nitrógeno por las correlaciones exhibidas a tres enlaces entre los protones metilénicos del grupo propargilo δ_H 3,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H) con el carbono del $N-CH_3$ en δ_C 42,1, el cual a su vez correlaciona con los hidrógenos metilénicos en δ_H 2,81 (dd, $J = 9,8; 6,6$ Hz, 2H, H-1') del alcaloide fenantrénico. Finalmente, el experimento NOESY (ver Figura 3-72) confirma la estructura propuesta dado que se observa por ejemplo la correlación entre los hidrógenos del metilo unido a nitrógeno ($N-CH_3$) δ_H 2,46 (s, 3H) y el δ_H 2,81 (dd, $J = 9,8; 6,6$ Hz, 2H, H-1') y δ_H 3,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, H-11). También entre los hidrógenos δ_H 3,50 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, H-11) y el hidrógeno δ_H 2,27 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-13) y δ_H 2,81 (dd, $J = 9,8; 6,6$ Hz, 2H, H-1') [139, 140].

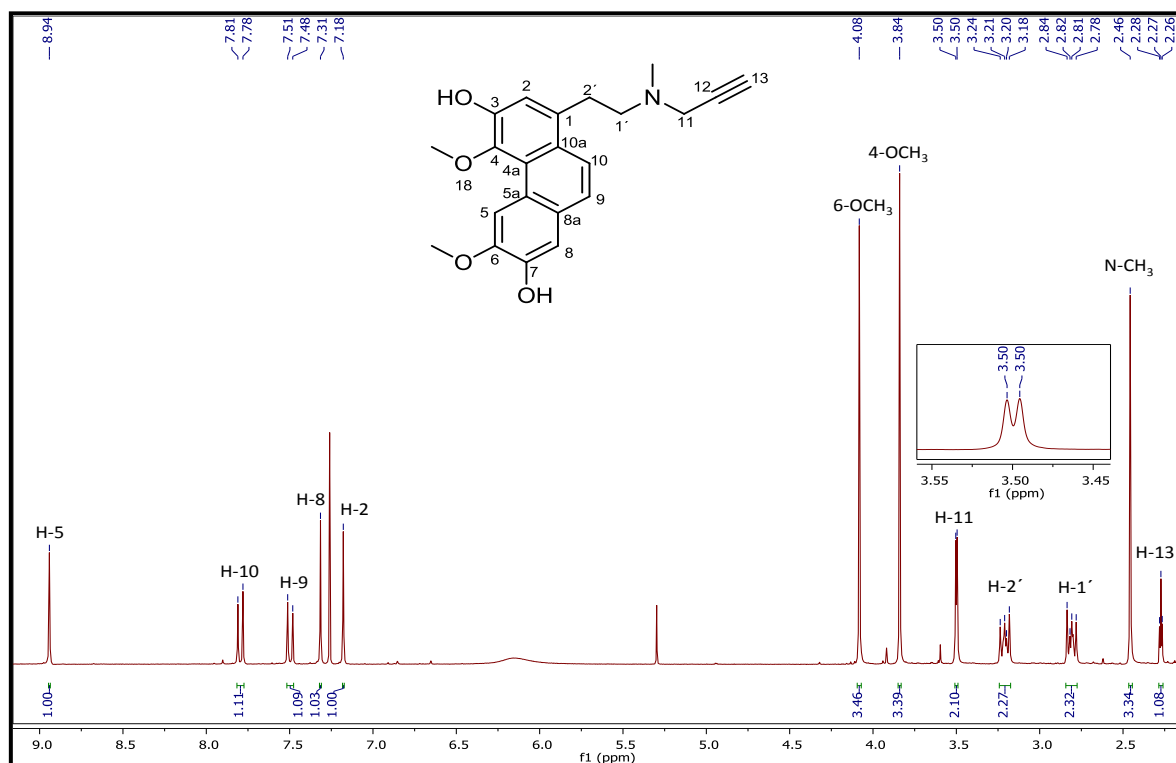


Figura 3-68. Espectro RMN ^1H de **S-1** (300 MHz, CDCl_3).

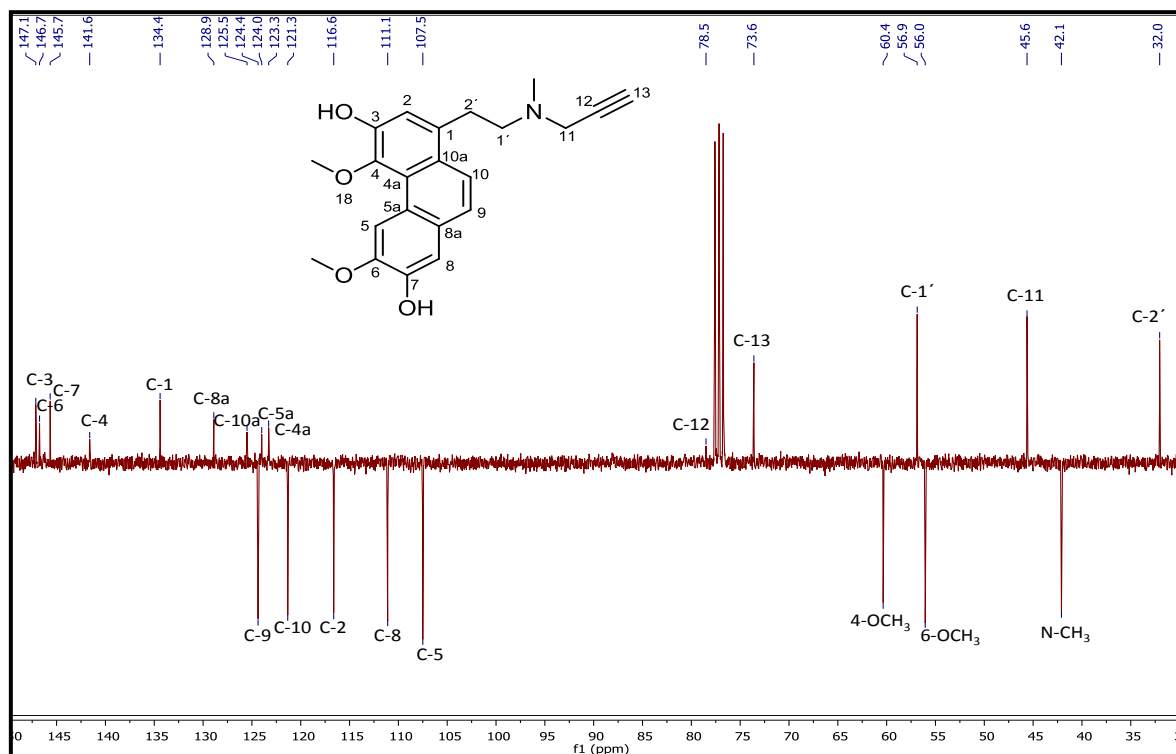


Figura 3-69. Espectro de RMN ^{13}C APT de **S-1** (75 MHz, CDCl_3).

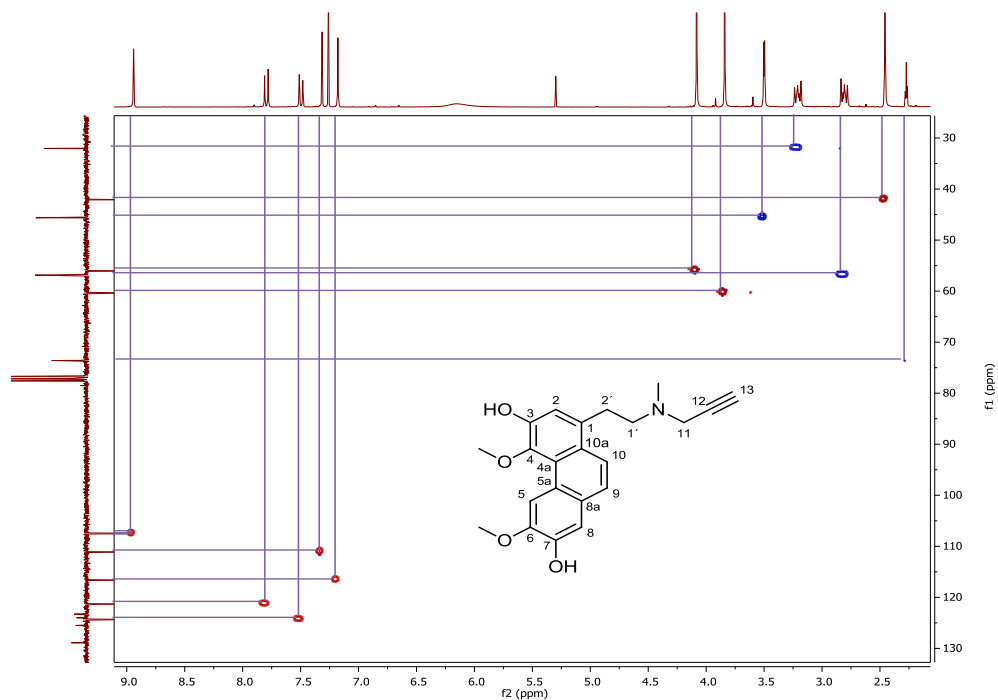


Figura 3-70. Espectro HSQC de **S-1** (300/75 MHz, CDCl₃).

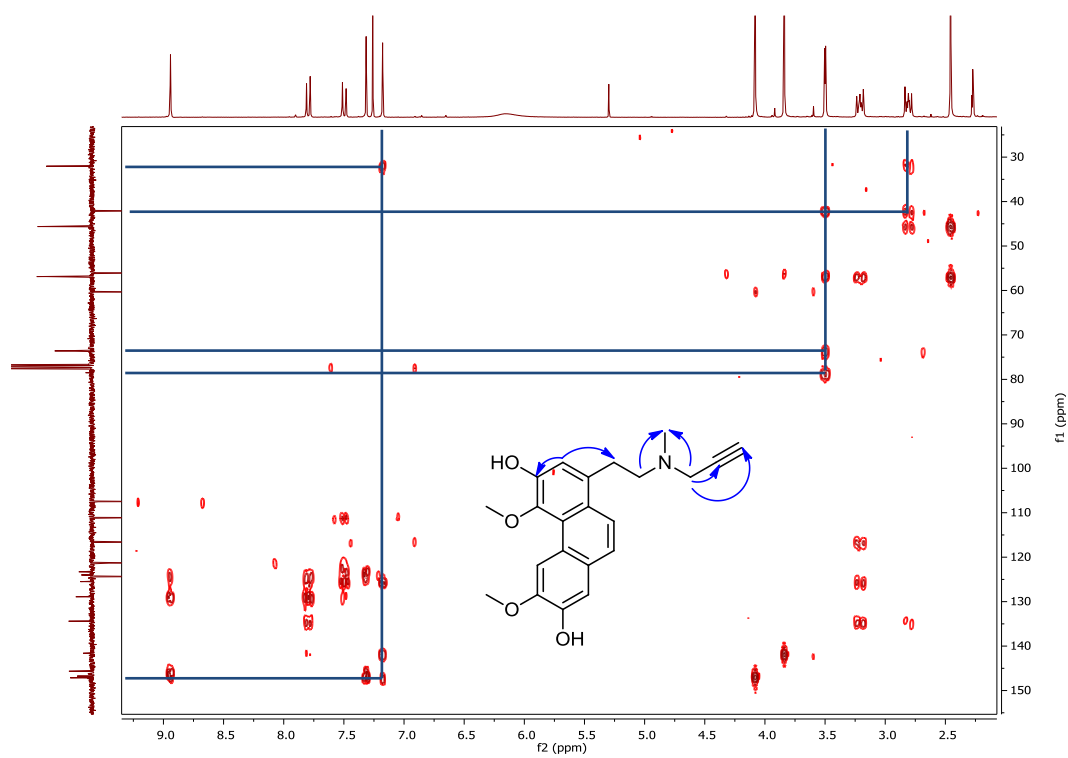


Figura 3-71. Espectro HMBC de **S-1** (300/75 MHz, CDCl₃).

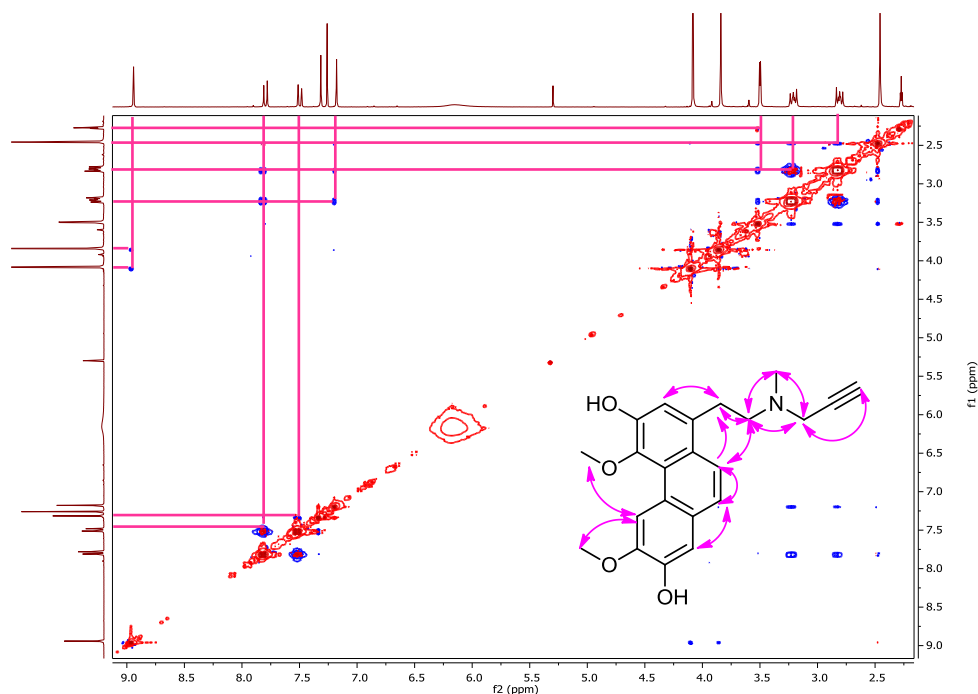


Figura 3-72. Espectro NOESY de **S-1** (300 MHz, CDCl_3).

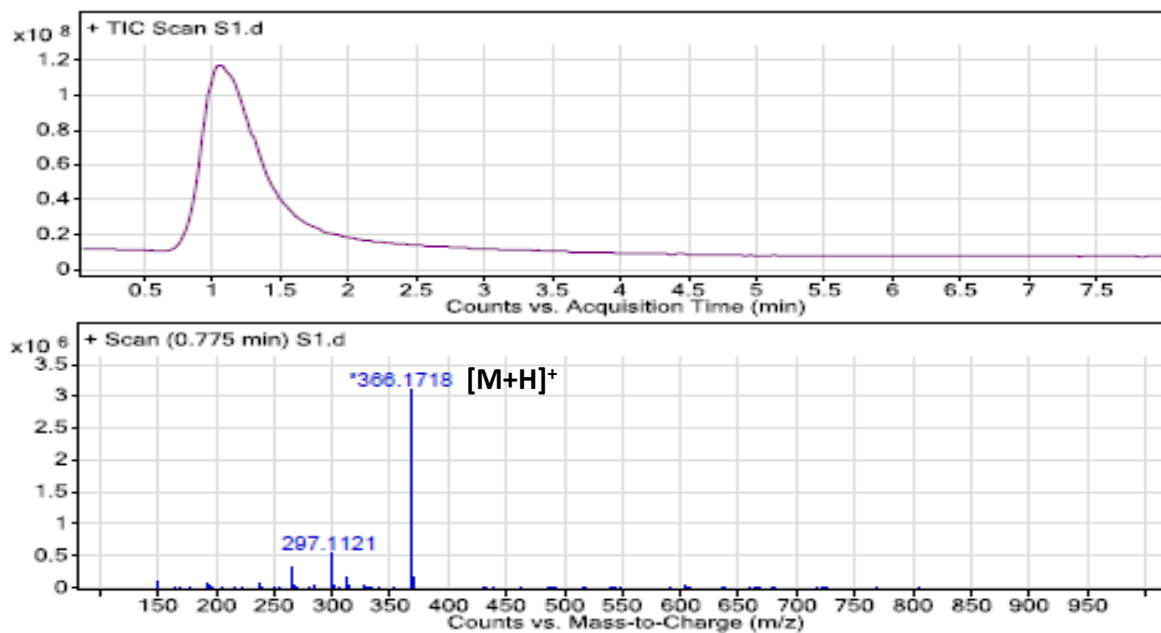
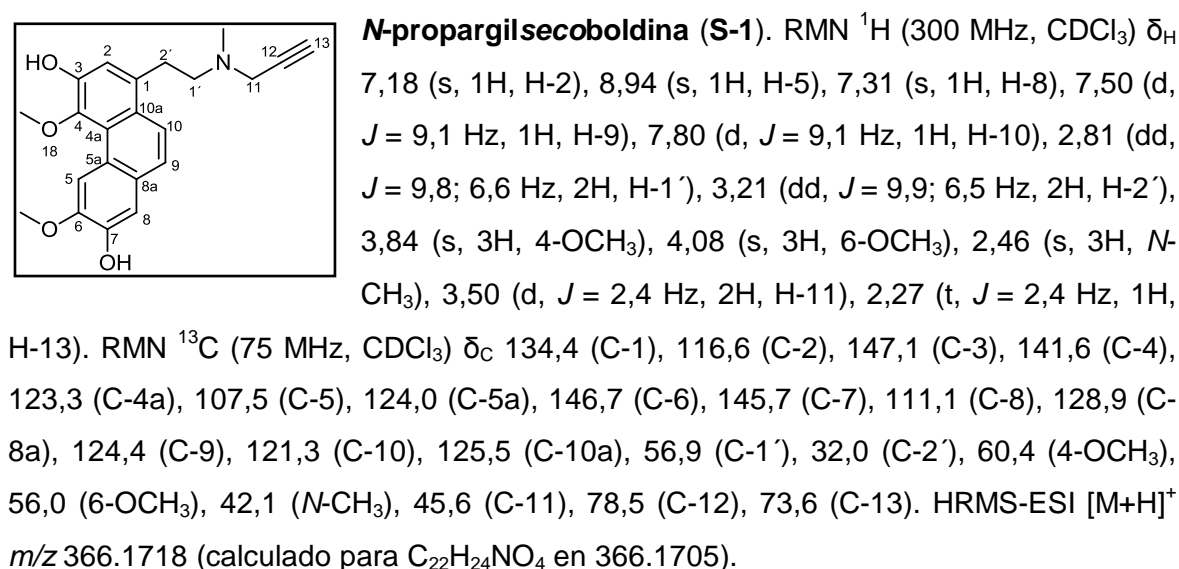
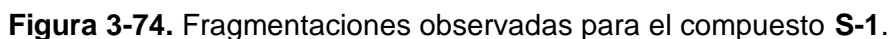


Figura 3-73. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de **S-1**.



Se obtuvo como un sólido amarillo, con un punto de fusión 144 °C. El análisis espectroscópico se realizó de la misma forma que para la *N*-propargilsecoboldina (ver numeral 3.5.1.1). Los experimentos de RMN ^1H (ver Figura 3-75), RMN ^{13}C APT (ver Figura 3-76) presentaron señales características de alcaloides fenantrénicos descritas anteriormente. La confirmación de la *N*-alquilación se evidenció mediante el análisis de los experimentos RMN 2D y de RMN ^1H en el que se puede apreciar la señal en δ_{H} 3,43 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H) correspondiente a los hidrógenos metilénicos del carbono 11 (δ_{C} 59,7) del grupo cinamilo que por su desplazamiento está unido a nitrógeno, también se observan los hidrógenos vinílicos en δ_{H} 6,33 (dt, $J = 15,8; 6,8$ Hz, 1H, H-12) y 6,57 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H-13).

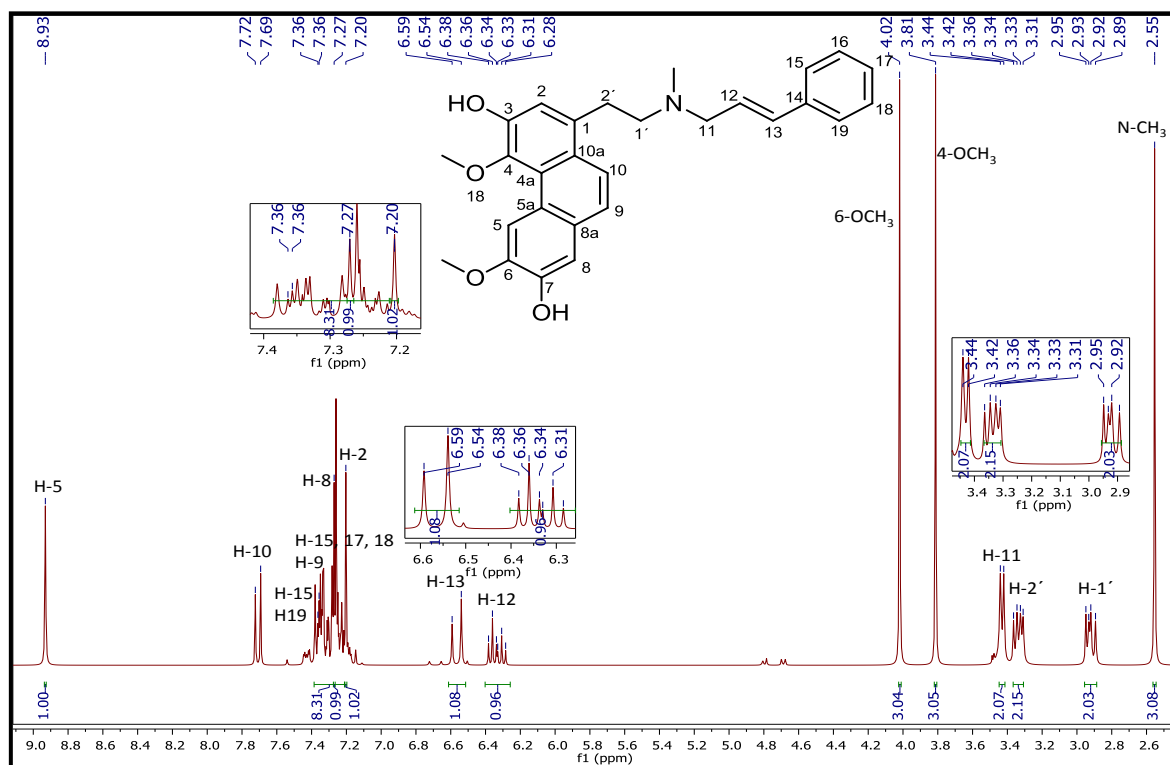


Figura 3-75. Espectro RMN ^1H de **S-2** (300 MHz, CDCl_3).

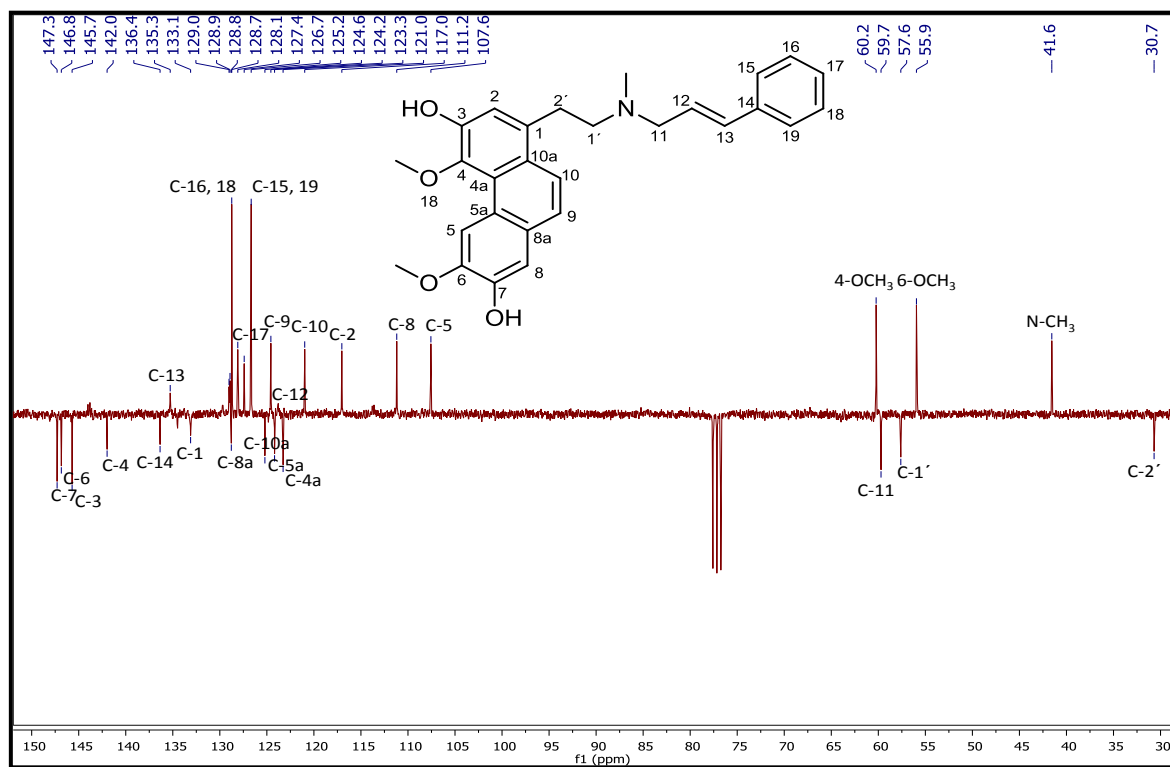


Figura 3-76. Espectro RMN ^{13}C de **S-2** (75 MHz, CDCl_3).

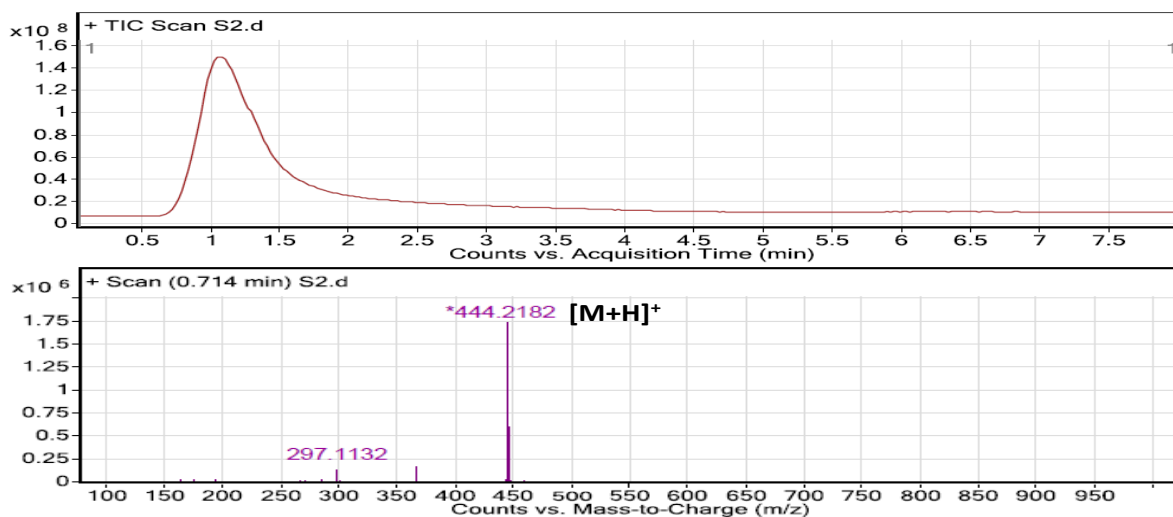


Figura 3-77. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de **S-2**.

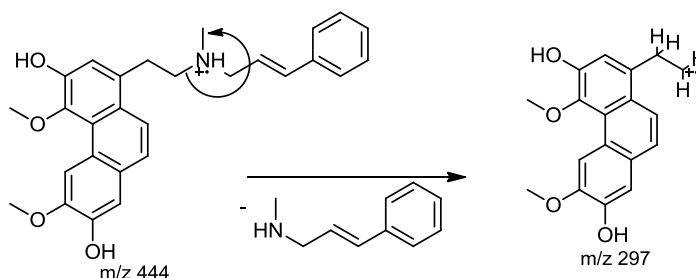
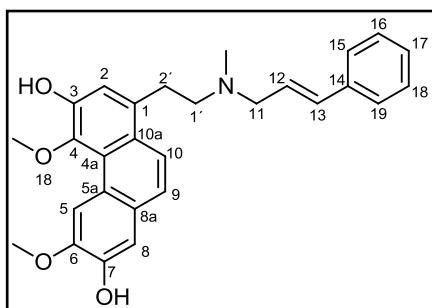


Figura 3-78. Fragmentaciones observadas para el compuesto **S-2**.



N-cinamilsecoboldina (S-2). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7,20 (s, 1H, H-2), 8,93 (s, 1H, H-5), 7,27 (s, 1H, H-8), 7,36 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-9), 7,70 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-10), 2,92 (dd, $J = 10,6; 6,5$ Hz, 2H, H-1'), 3,33 (dd, $J = 11,0; 6,3$ Hz, 2H, H-2'), 3,81 (s, 3H, 4- OCH_3), 4,02 (s, 3H, 6- OCH_3), 2,55 (s, 3H, $N\text{-CH}_3$), 3,43 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H, H-11), 6,33 (dt, $J = 15,8; 6,8$ Hz, 1H, H-12), 6,57 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, H-13), 7,35 – 7,33 (m, 2H, H-15 y 19), 7,31 – 7,27 (m, 2H, H-16 y 18), 7,27 – 7,23 (m, 1H, H-17). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 133,1 (C-1), 117,0 (C-2), 145,7 (C-3), 142,0 (C-4), 123,3 (C-4a), 107,6 (C-5), 124,2 (C-5a), 146,8 (C-6), 147,3 (C-7), 111,2 (C-8), 128,8 (C-8a), 124,6 (C-9), 121,0 (C-10), 125,2 (C-10a), 57,6 (C-1'), 30,7 (C-2'), 60,2 (4- OCH_3), 55,9 (6- OCH_3), 41,6 ($N\text{-CH}_3$), 59,7 (C-11), 124,2 (C-12), 135,3 (C-13), 136,4 (C-14), 126,7 (C-15 y C-19), 128,7 (C-16 y C-18), 128,1 (C-17). HRMS-ESI $[M+H]^+$ m/z 444.2182 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{NO}_4$ en 444.2174).

3.5.1.3 *N*-prenil-7-*O*-preniloxisecoboldina (*S*-3).

Se obtuvo como un sólido amarillo, con un punto de fusión 65 °C. El análisis espectral se realizó de la misma forma que para los dos compuestos anteriores mostrando señales características de alcaloides fenantrénicos. En este caso el grupo prenilo alquiló dos posiciones del alcaloide: el grupo amino y el grupo fenol del anillo C. La confirmación de la prenilación se evidenció mediante el análisis de los experimentos RMN 2D, RMN ^1H (ver Figura 3-79) y RMN ^{13}C APT (ver Figura 3-80) en el que se puede apreciar la señal en δ_{H} 3,43 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H) correspondiente a los hidrógenos metilénicos sobre le carbono 11 (δ_{C} 53,9) del grupo N-prenilo, también se observa el hidrógeno vinílico en δ_{H} 5,37 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H-12). En cuanto a la *O*-prenilación, se aprecia una señal en δ_{H} 4,75 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H) correspondiente a los hidrógenos metilénicos sobre le carbono 16 (δ_{C} 65,6) del grupo *O*-prenilo que por su desplazamiento está unido a oxígeno y otra señal en δ_{H} 5,62 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H) correspondiente al hidrógeno vinílico del carbono 17 (δ_{C} 119,7).

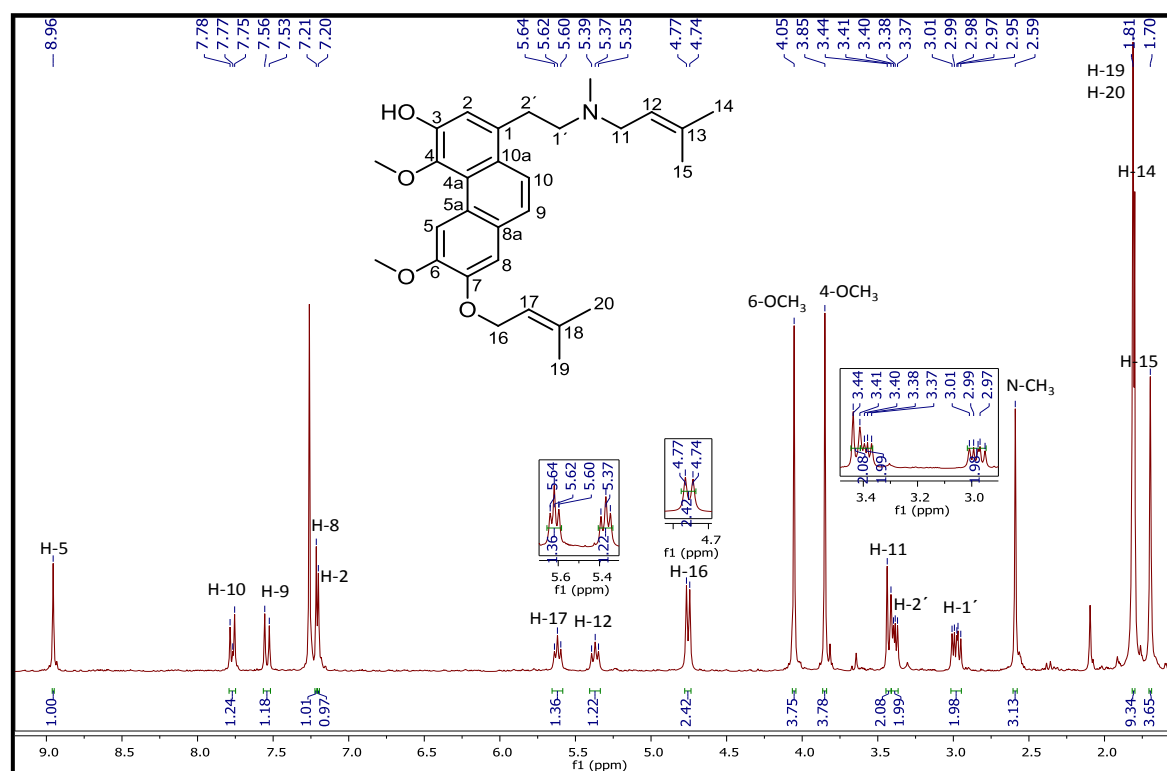


Figura 3-79. Espectro RMN ^1H de **S-3** (300 MHz, CDCl_3).

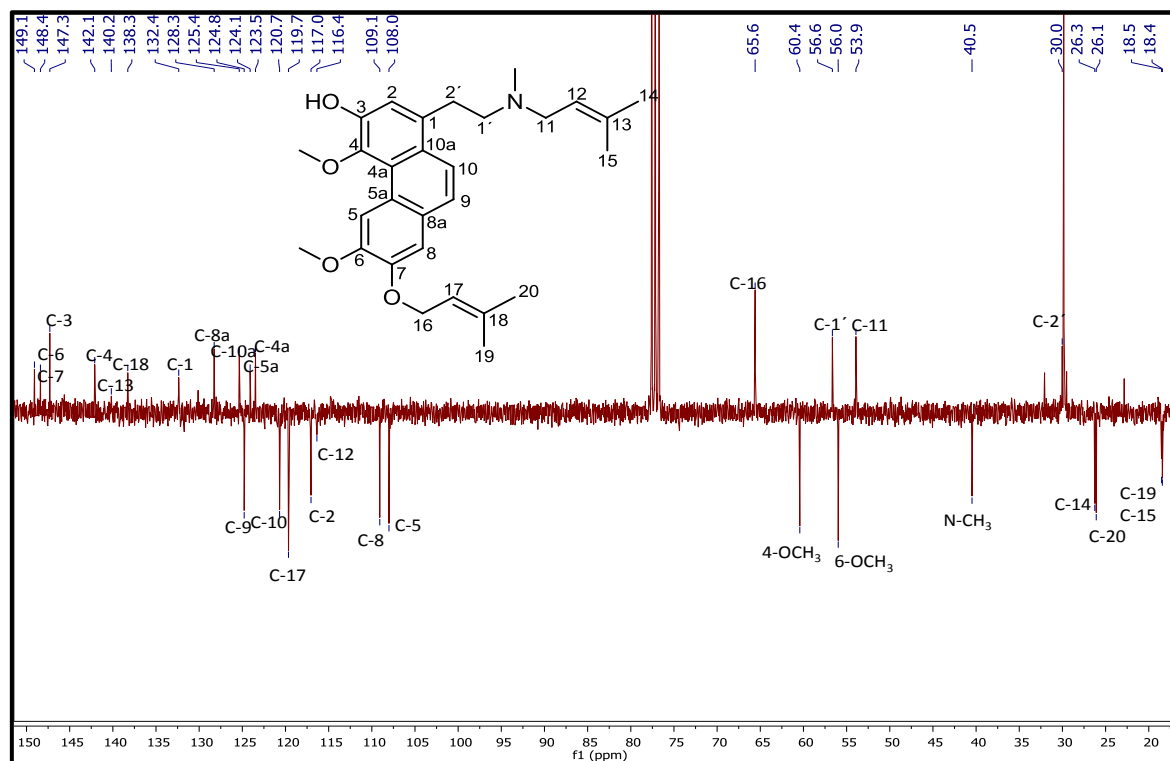


Figura 3-80. Espectro RMN ^{13}C APT de **S-3** (75 MHz, CDCl_3).

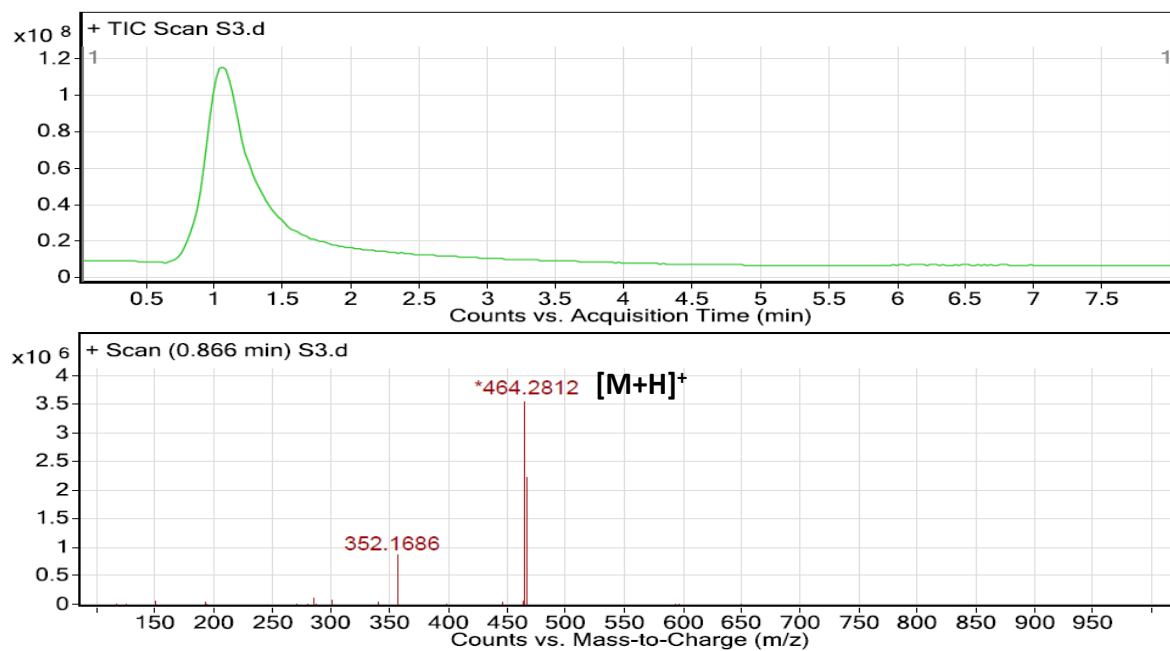


Figura 3-81. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de **S-3**.

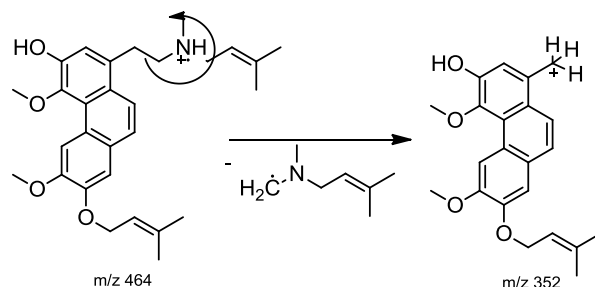
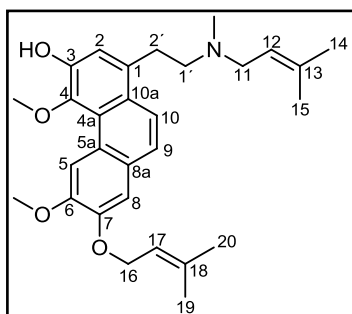


Figura 3-82. Fragmentaciones observadas para el compuesto **S-3**.



N-prenil-7-O-preniloxisecoboldina (3). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7,20 (s, 1H, H-2), 8,96 (s, 1H, H-5), 7,21 (s, 1H, H-8), 7,54 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, H-9), 7,77 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, H-10), 3,03 – 2,95 (m, 2H, H-1'), 3,43 – 3,34 (m, 2H, H-2'), 3,85 (s, 3H, 4-OCH₃), 4,05 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,59 (s, 3H, N-CH₃), 3,43 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-11), 5,37 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H-12), 1,81 (s, 9H, H-14, H-19 y H-20), 1,70 (s, 3H, H-15), 4,75 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, H-16), 5,62 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H, H-17).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ_{C} 132,4 (C-1), 117,0 (C-2), 147,3 (C-3), 142,1 (C-4), 123,5 (C-4a), 108,0 (C-5), 124,1 (C-5a), 149,1 (C-6), 148,4 (C-7), 109,1 (C-8), 128,3 (C-8a), 124,8 (C-9), 120,7 (C-10), 125,4 (C-10a), 56,6 (C-1'), 30,0 (C-2'), 60,4 (4-OCH₃), 56,0 (6-OCH₃), 40,5 (N-CH₃), 53,9 (C-11), 116,4 (C-12), 140,2 (C-13), 26,3 (C-14), 18,4 (C-15), 18,5 (C-19), 26,1 (C-20), 65,6 (C-16), 119,7 (C-17), 138,3 (C-18). HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 464.2812 (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{NO}_4$ en 464.2800).

3.5.1.4 *N*-prenilsecoboldina (S-4).

El compuesto S-4 se obtuvo como un sólido amarillo, con un punto de fusión 272 °C. Siguiendo el mismo análisis que se realizó para los anteriores compuestos (S-1, S-2 y S-3) se logró establecer la estructura de la *N*-prenilsecoboldina. El experimento de RMN ^1H (ver Figura 3-83) muestra señales en δ_{H} 3,48 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), correspondiente a los hidrógenos metilénicos sobre el carbono 11 del grupo *N*-prenilo (δ_{C} 56,8), también se observa el hidrógeno vinílico en δ_{H} 5,34 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H-12) y dos señales singletes

que integran para tres hidrógenos cada una en δ_H 1,86 (s, 3H, H-14) y δ_H 1,79 (s, 3H, H-15).

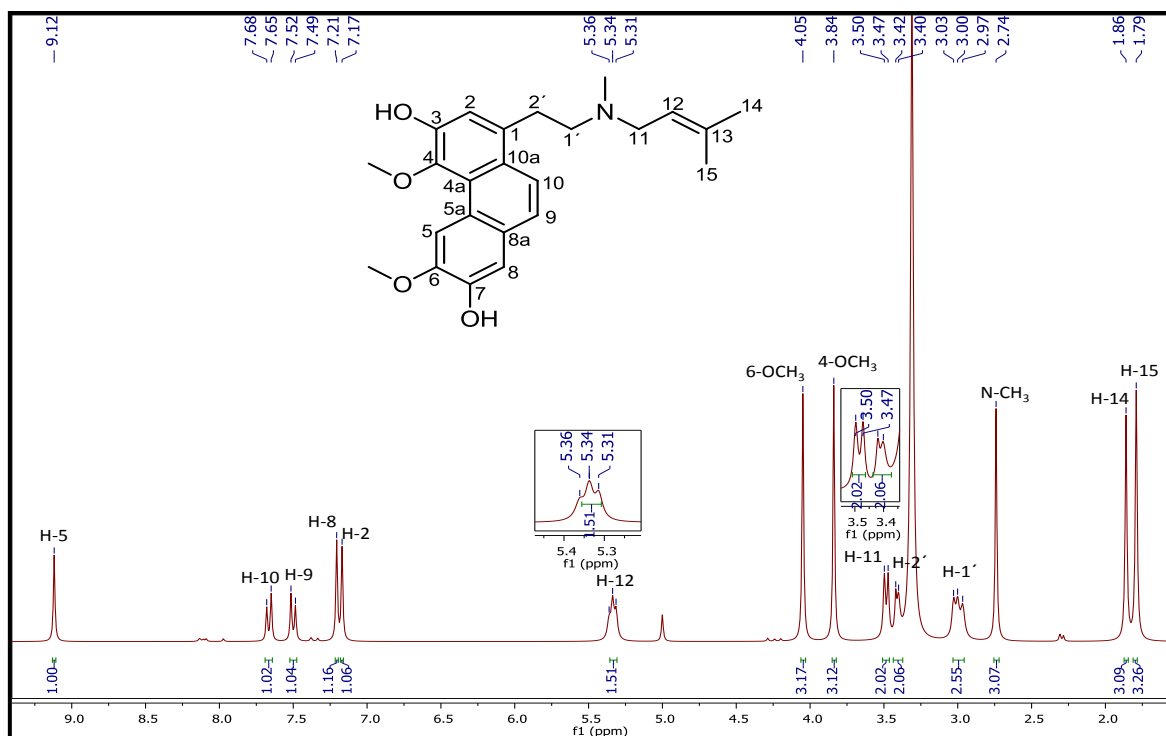


Figura 3-83. Espectro RMN ¹H de S-4 (300 MHz, CD₃OD).

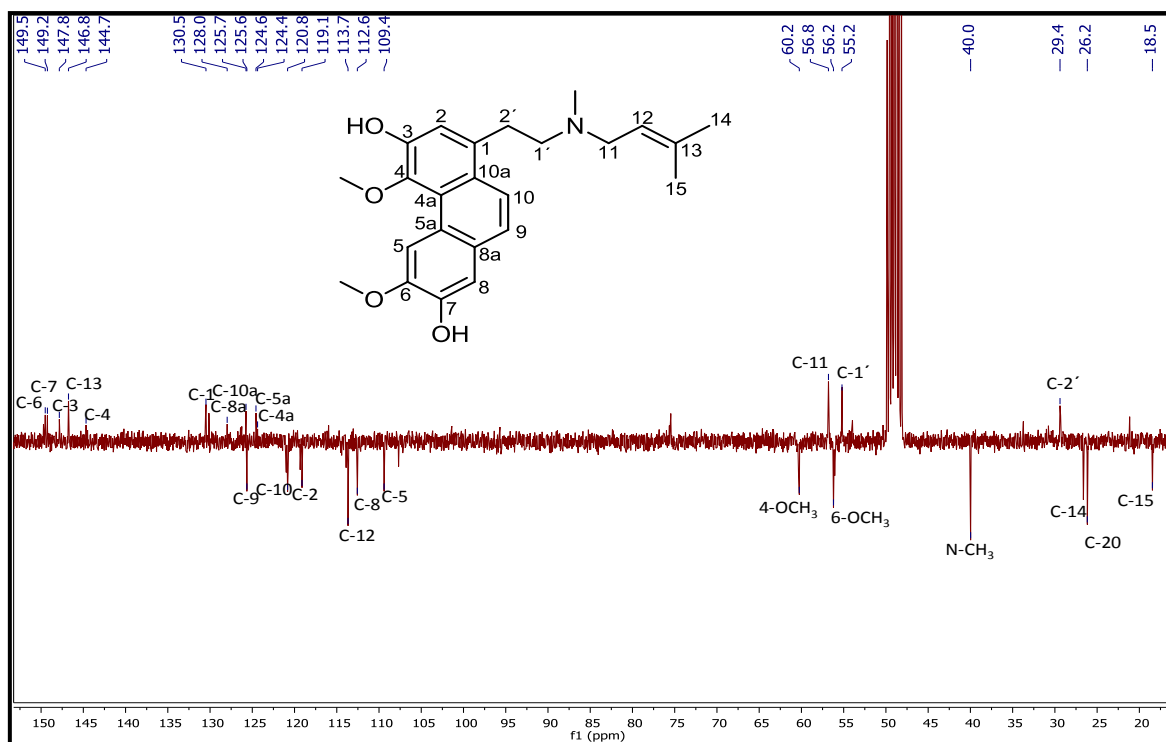


Figura 3-84. Espectro RMN ¹³C APT de S-4 (75 MHz, CD₃OD).

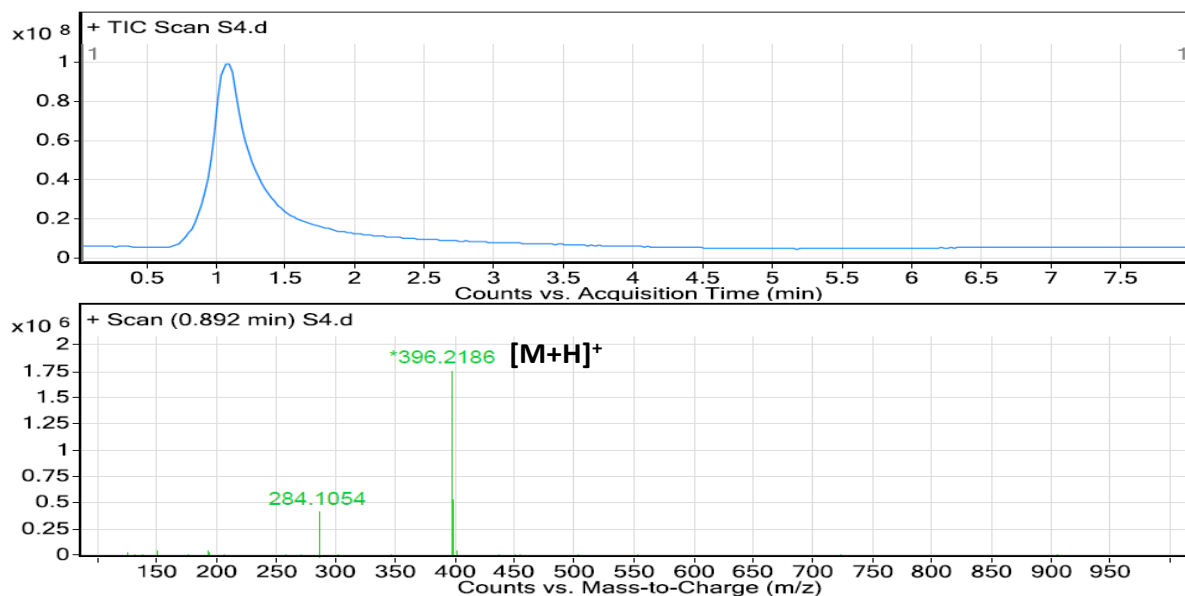


Figura 3-85. TIC y espectro de masas HRMS-ESI de **S-4**.

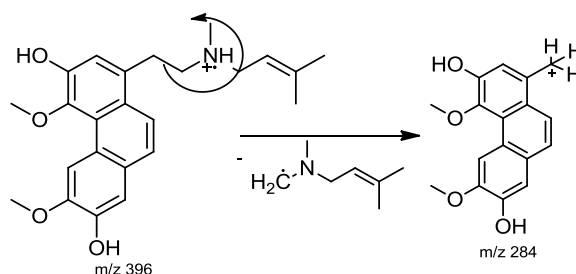
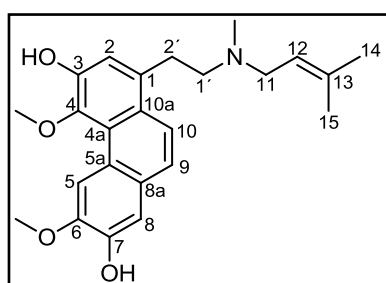


Figura 3-86. Fragmentaciones observadas para el compuesto **S-4**.



N-prenilsecoboldina (S-4). RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD)

δ_{H} 7,17 (s, 1H, H-2), 9,12 (s, 1H, H-5), 7,21 (s, 1H, H-8), 7,51 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-9), 7,67 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-10), 3,04 – 2,96 (m, 2H, H-1'), 3,42 – 3,33 (m, 2H, H-2'), 3,84 (s, 3H, 4- OCH_3), 4,05 (s, 3H, 6- OCH_3), 2,74 (s, 3H, $N\text{-CH}_3$), 3,48 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, H-11), 5,34 (t, $J = 7,7$

Hz, 1H, H-12), 1,86 (s, 3H, H-14), 1,79 (s, 3H, H-15). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ_{C} 130,5 (C-1), 119,1 (C-2), 147,8 (C-3), 144,7 (C-4), 124,4 (C-4a), 109,4 (C-5), 124,6 (C-5a), 149,5 (C-6), 149,2 (C-7), 112,6 (C-8), 128,0 (C-8a), 125,6 (C-9), 120,8 (C-10), 125,7 (C-10a), 55,2 (C-1'), 29,4 (C-2'), 60,2 (4- OCH_3), 56,2 (6- OCH_3), 40,0 ($N\text{-CH}_3$), 56,8 (C-11), 113,7 (C-12), 146,8 (C-13), 26,2 (C-14), 18,5 (C-15). HRMS-ESI $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 396.2186 (calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NO}_4$ en 396.2174).

3.6 Actividad antibacteriana del aceite esencial, los compuestos aislados y sintetizados.

De acuerdo con los resultados de actividades biológicas presentadas por varias sustancias aisladas de plantas del género *Ocotea*, y dentro de las investigaciones de los proyectos desarrollados por el Laboratorio de Productos Naturales Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia encaminadas en la búsqueda de compuestos bioactivos de plantas en Colombia, se realizaron ensayos de actividad antibacteriana al aceite esencial y los metabolitos aislados de la hojas de *O. caudata*, así como a los compuestos sintetizados.

3.6.1 Actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *O. caudata*.

Los resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *O. caudata* por el método de difusión en pozo, frente a cuatro cepas bacterianas se presentan en la Tabla 3-7.

Tabla 3-7. Diámetro de la zona de inhibición (mm) del aceite esencial de *O. caudata*.

Concentración del aceite, mg/mL	Diámetro de inhibición (mm±DE.)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
5	8.0±0.0	14.1±0.0	NI	NI
10	12.1±0.0	18.9±0.0	NI	NI
20	15.6±0.3	21.8±0.3	NI	NI
Control positivo ^a	22.0±0.5	28.0±0.0	25.0±0.0	22.0±0.0

DE: Desviación estándar; NI: No presenta inhibición; ^aGentamicina 1.5 mg/mL

De acuerdo con la Tabla 3-7, el aceite esencial de hojas de *O. caudata* presentó actividad antibacteriana moderada frente a las bacterias Gram positivas [91]. El aceite esencial está constituido principalmente por sesquiterpenos los cuales pueden ser considerados responsables de la actividad antibacteriana. Aunque el aceite esencial es una mezcla compleja de metabolitos, normalmente su actividad se debe a los componentes mayoritarios. Posiblemente el germacreno D, biciclogermacreno [131] y β -cariofileno sean los responsables de esta actividad. El β -cariofileno ha demostrado tener actividad frente *S. aureus*, el α -humuleno y el elemol han exhibido actividad

antimicrobiana y el α -bisabolol parece ser el responsable de la actividad antibacteriana en *Lantana achyranthifolia* [142, 143]. No obstante en una mezcla tan compleja como en un aceite esencial, es difícil atribuir la actividad a un solo componente. Es importante considerar no solamente los compuestos más abundantes sino también los que se encuentran a nivel de trazas, así como tener en cuenta los efectos antagonistas y sinérgicos de los compuestos en el aceite que pueden dar origen a la acción antibacteriana del aceite [142,144,145].

3.6.2 Actividad antibacteriana de los metabolitos aislados de hojas de *O. caudata*.

La actividad antibacteriana de los compuestos aislados de hojas de *O. caudata* se presenta en las Tabla 3-8, 3-9 y 3-10.

Tabla 3-8. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de la mezcla de ácidos grasos (**Oc-1** y **Oc-2**), la mezcla de esteroides (**Oc-3**, **Oc-4** y **Oc-5**), el alcohol graso (**Oc-6**) y los sesquiterpenos (**Oc-8** y **Oc-9**).

Compuesto	Diámetro de inhibición (mm±DE)				
	Concentración mg/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Mezcla Oc-1 y Oc-2	0.5	13±0.0	10±0.0	6±0.0	6±0.0
	1	16±0.0	12±0.0	7±0.0	9±0.0
	2	18±0.6	13±0.0	10±0.6	11±0.0
Mezcla Oc-3, Oc-4 y Oc-5	0.5	13±0.6	11±0.0	7±0.6	8±0.6
	1	15±0.6	12±0.0	9±0.6	9±0.6
	2	17±0.6	13±0.0	11±0.6	12±0.6
Oc-5	0.5	12±0.0	8±0.6	9±0.6	8±0.6
	1	15±0.6	10±0.0	10±0.6	9±0.6
	2	18±0.6	12±0.5	12±0.6	11±0.6
Oc-6	0.5	11±0.0	7±0.0	6±0.0	5±0.6
	1	15±0.0	10±0.0	8±0.0	7±0.0
	2	16±0.5	12±0.6	10±0.6	9±0.6
Oc-8	0.5	NI	NI	NI	NI
	1	NI	NI	NI	NI
	2	NI	NI	NI	NI
Oc-9	0.5	NI	NI	NI	NI
	1	NI	NI	NI	NI
	2	NI	NI	NI	NI
Control + (vancomicina)		20±0.6	13±0.0	-	-
Control + (gentamicina)		-	-	13.0±0.0	15.0±0.6
Control – (DMSO)		NI	NI	NI	NI

DE: Desviación estándar NI: No presenta inhibición; Gentamicina 50 µg/mL; Vancomicina 150 µg/mL.

En la Tabla 3-8 se puede observar que las mezclas de ácidos grasos (**Oc-1** y **Oc-2**) y de esteroides (**Oc-3**, **Oc-4** y **Oc-5**), junto con el β -sitosterol (**Oc-5**) presentaron las mejores actividades antibacterianas frente a las cuatro bacterias ensayadas. Los ácidos grasos son reconocidos por su acción bactericida o bacteriostática contra microorganismos oportunistas. No obstante, el mecanismo de acción no ha sido muy bien establecido, se sabe que los ácidos grasos interrumpen la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en la membrana celular, también pueden inhibir la actividad enzimática, disminución de la absorción de nutrientes, intervienen en reacciones de peroxidación o lisis directa de células bacterianas. Su efecto de amplio espectro y el modo de acción no específico los hace idóneos como agentes antibacterianos para diversas aplicaciones en medicina, agricultura y conservación de alimentos, especialmente donde el uso de antibióticos convencionales es indeseable o prohibido [146]. El β -sitosterol (**Oc-5**) presenta una variedad de actividades, entre ellas su actividad antibacteriana y principalmente como agente antidiabético, antioxidante, antiinflamatorio, antipirético y anti-cancerígeno [147]. En cuanto al ácido cósico (**Oc-9**) y su éster metílico (**Oc-8**) no presentaron actividad antibacteriana, en la literatura no se encuentran reportes de este tipo de acción pero si de su actividad nematocida [148].

Tabla 3-9. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de los compuestos fenólicos (**Oc-7**, **Oc-10 – Oc-15**) aislados de hojas de *O. caudata*.

Compuesto	Diámetro de inhibición (mm \pm DE)				
	Concentración mg/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Oc-7	0.5	15 \pm 0.0	8 \pm 0.0	9 \pm 0.0	9 \pm 0.0
	1	16 \pm 0.0	9 \pm 0.6	10 \pm 0.6	10 \pm 0.6
	2	19 \pm 0.6	11 \pm 0.6	12 \pm 0.0	13 \pm 0.6
Oc-10	0.5	4 \pm 0.0	NI	NI	NI
	1	6 \pm 0.0	4 \pm 0.0	2 \pm 0.0	3 \pm 0.0
	2	9 \pm 0.0	6 \pm 0.0	4 \pm 0.6	5 \pm 0.6
Oc-11	0.5	13 \pm 0.6	7 \pm 0.6	8 \pm 0.0	8 \pm 0.0
	1	15 \pm 0.6	9 \pm 0.0	9 \pm 0.0	9 \pm 0.0
	2	17 \pm 0.6	10 \pm 0.0	11 \pm 0.6	11 \pm 0.6
Oc-12	0.5	13 \pm 0.0	7 \pm 0.0	5 \pm 0.0	6 \pm 0.0
	1	16 \pm 0.6	9 \pm 0.0	7 \pm 0.0	7 \pm 0.0
	2	18 \pm 0.6	10 \pm 0.6	8 \pm 0.6	8 \pm 0.6
Oc-13	0.5	13 \pm 0.2	6 \pm 0.0	3 \pm 0.6	5 \pm 0.0
	1	15 \pm 0.2	8 \pm 0.0	7 \pm 0.0	7 \pm 0.0
	2	16 \pm 0.5	9 \pm 0.6	9 \pm 0.6	10 \pm 0.0
Mezcla Oc-14	0.5	13 \pm 0.0	6 \pm 0.0	4 \pm 0.0	6 \pm 0.0
	1	14 \pm 0.0	8 \pm 0.0	7 \pm 0.0	7 \pm 0.0

Compuesto	Diámetro de inhibición (mm±DE)				
	Concentración mg/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
y Oc-15	2	16±0.0	9±0.6	9±0.6	10±0.0
Control + (vancomicina)		20±0.6	13±0.0	-	-
Control + (gentamicina)		-	-	13.0±0.0	15.0±0.6
Control – (DMSO)		NI	NI	NI	NI

DE: Desviación estándar NI: No presenta inhibición; Gentamicina 50 µg/mL; Vancomicina 150 µg/mL.

Los compuestos fenólicos son reconocidos por sus actividades biológicas, entre ellas la antibacteriana. La Tabla 3-9 confirma el efecto de los compuestos fenólicos frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas [149 – 151]. La acción antimicrobiana de los compuestos fenólicos está relacionada con la inactivación de las enzimas celulares, la cual depende de la velocidad de penetración de la sustancia en la célula o es causada por los cambios de permeabilidad de la membrana [152]. No obstante, Cushnie y Lamb [151] hicieron una revisión sobre el mecanismo de acción de algunos flavonoides concluyendo que éste depende de los sustituyentes del núcleo en mención; por ejemplo la quercetina (**Oc-12**) inhibe la síntesis de ácidos nucleicos. En la Tabla 3-9 se observa que los fenoles simples: el ácido *p*-hidroxifenilacético (**Oc-11**) y su éster etílico (**Oc-7**), presentan inhibición de las bacterias, siendo más susceptibles las Gram negativas que las Gram positivas a los fenoles en cuestión. Es de anotar que comparando la actividad presentada por los flavonoides (**Oc-10**, **Oc-12** – **Oc-15**), se observa que la 7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona (**Oc-10**) presentó la menor actividad, esto podría inferir que la ausencia del grupo hidroxilo en el carbono 5 (anillo A del flavonoide) disminuye la acción.

Tabla 3-10. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de los alcaloides (**Oc-6** – **Oc-26**) aislados de hojas de *O. caudata*.

Compuesto	Diámetro de inhibición (mm±DE)				
	Concentración mg/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Oc-16	0.5	NI	NI	NI	NI
	1	11±0.6	10±0.6	NI	NI
	2	12±0.6	11±0.6	9±0.6	NI
Oc-17	0.5	NI	NI	NI	NI
	1	9±0.6	8±0.6	NI	NI
	2	10±0.6	10±0.0	5±0.6	NI
Oc-18	0.5	13±0.6	12±0.4	NI	NI
	1	15±0.6	14±0.6	NI	NI

Compuesto	Diámetro de inhibición (mm±DE)				
	Concentración mg/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Oc-19	2	17±0.6	17±0.5	NI	NI
	0.5	15±0.0	15±0.6	NI	NI
	1	16±0.6	17±0.6	NI	NI
	2	18±0.6	19±0.6	10±0.6	NI
Oc-20	0.5	13±0.6	14±0.0	NI	NI
	1	15±0.6	16±0.6	NI	NI
	2	16±0.6	17±0.6	6±0.6	NI
Oc-21	0.5	6±0.6	6±0.6	NI	NI
	1	8±0.6	8±0.6	NI	NI
	2	11±0.6	12±0.6	NI	NI
Oc-22	0.5	NI	NI	NI	NI
	1	NI	NI	NI	NI
	2	NI	NI	NI	NI
Oc-23	0.5	NI	NI	NI	NI
	1	NI	NI	NI	NI
	2	NI	NI	NI	NI
Oc-24	0.5	NI	NI	NI	NI
	1	3±0.6	NI	NI	NI
	2	6±0.6	NI	NI	NI
Oc-25	0.5	9±0.6	7±0.6	NI	NI
	1	11±0.6	9±0.6	NI	NI
	2	13±0.6	12±0.6	NI	NI
Oc-26	0.5	7±0.6	7±0.0	NI	NI
	1	9±0.6	8±0.0	NI	NI
	2	10±0.6	9±0.6	NI	NI
Control + (vancomicina)		20±0.6	13±0.0	-	-
Control + (gentamicina)		-	-	13.0±0.0	15.0±0.6
Control – (DMSO)		NI	NI	NI	NI

DE: Desviación estándar NI: No presenta inhibición; Gentamicina 50 µg/mL; Vancomicina 150 µg/mL.

El estudio de actividad antibacteriana de los once alcaloides aislados de *O. caudata* frente a las cuatro cepas bacterianas mostró que nueve de ellos presentan actividad contra las bacterias Gram positivas (*B. subtilis* y *S. aureus*) y solamente cuatro: la thalictuberina (**Oc-16**), 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**), la 3-metoxinordomesticina (**Oc-19**) y la *nordomesticina* (**Oc-20**) presentaron actividad frente a las dos bacterias Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) a la concentración de 2 mg/mL; mientras que con la boldina e isoboldina no hubo inhibición del crecimiento de los microorganismos (ver Tabla 3-10). Abbasoglu y colaboradores [153] demostraron que los alcaloides con grupos fenólicos son menos activos que sus respectivos derivados metoxilados, tal es el caso de la thalictuberina (**Oc-16**) y la 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**) donde la **Oc-17** mostró menor acción que **Oc-16**; los alcaloides que contienen el grupo bencenodioxol

son más activos como la thalictuberina (**Oc-16**), la 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**), la 3-metoxinordomesticina (**Oc-19**) y la *nordomesticina* (**Oc-20**) que mostraron actividad contra tres de las cuatro bacterias ensayadas. Otro factor interesante es que los alcaloides *noraporfínicos* presentan efecto antibacteriano, este hecho explica la nula actividad de la isoboldina (**Oc-22**) y la boldina (**Oc-23**) [153, 154].

3.6.3 Actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados a partir de boldina.

Tabla 3-11. Diámetro de la zona de inhibición (mm) de los compuestos sintetizados (**S-1** – **S-4**).

Compuesto	Diámetro de inhibición (mm±DE)				
	Concentración mg/mL	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
S-1	0.5	4±0.0	NI	NI	NI
	1	6±0.0	NI	NI	NI
	2	8±0.0	NI	NI	NI
S-2	0.5	11±0.6	11±0.6	NI	NI
	1	12±0.6	12±0.6	NI	NI
	2	15±0.0	14±0.6	NI	NI
S-3	0.5	11±0.0	10±0.6	NI	NI
	1	12±0.0	12±0.0	NI	NI
	2	14±0.0	13±0.6	NI	NI
S-4	0.5	8±0.0	6±0.0	NI	NI
	1	9±0.0	10±0.6	NI	NI
	2	11±0.6	12±0.6	NI	NI
Control + (vancomicina)		20±0.6	13±0.0	-	-
Control + (gentamicina)		-	-	13.0±0.0	15.0±0.6
Control – (DMSO)		NI	NI	NI	NI

DE: Desviación estándar NI: No presenta inhibición; Gentamicina 50 µg/mL; Vancomicina 150 µg/mL.

En la Tabla 3-11 se aprecia que los compuestos sintetizados presentan actividad únicamente contra las dos bacterias Gram positivas (*B. subtilis* y *S. aureus*), siendo las Gram negativas menos susceptibles a la acción de ellos. No obstante la síntesis de los alcaloides tipo secoboldina a partir de boldina (**Oc-23**), modificó la actividad antibacteriana del compuesto de partida (**Oc-23**) puesto que la boldina no inhibió el crecimiento de los microorganismos ensayados (ver Tabla 3-10); mientras que los cuatro compuestos sintetizados presentaron acción frente a las bacterias Gram positivas. En este sentido, comparando los alcaloides fenantrénicos sintetizados se pudo observar que al agregar un grupo cinamilo al nitrógeno (**S-2**) se presentó la mayor inhibición del

crecimiento de los microorganismos Gram positivos contrastando con **S-1** que resultó de la adición de un propargilo; mientras que en los prenilo-derivados (**S-3** y **S-4**) la *N,O*-diprenilación (**S-3**) fue más efectiva en la acción contra las bacterias Gram positivas que la *N*-prenilación (**S-4**). De lo anterior, es posible concluir que en la síntesis de alcaloides fenantrénicos a partir de alcaloides aporfínicos se puede mejorar la actividad antibacteriana con agentes alquilantes que conlleven a la alquilación del grupo amino, vía degradación de Hofmann, y todos los grupos fenólicos del núcleo aporfínico, empleando principalmente compuestos con grupos voluminosos; por ejemplo con anillos aromáticos como el caso del bromuro de cinamilo.

A manera de ejemplo en la Figura 3-87 se presentan los halos de inhibición de la 3-metoxinordomesticina frente a las cuatro bacterias ensayadas, obtenidos en los ensayos *in vitro* de la actividad antibacteriana por el método de difusión en pozo.

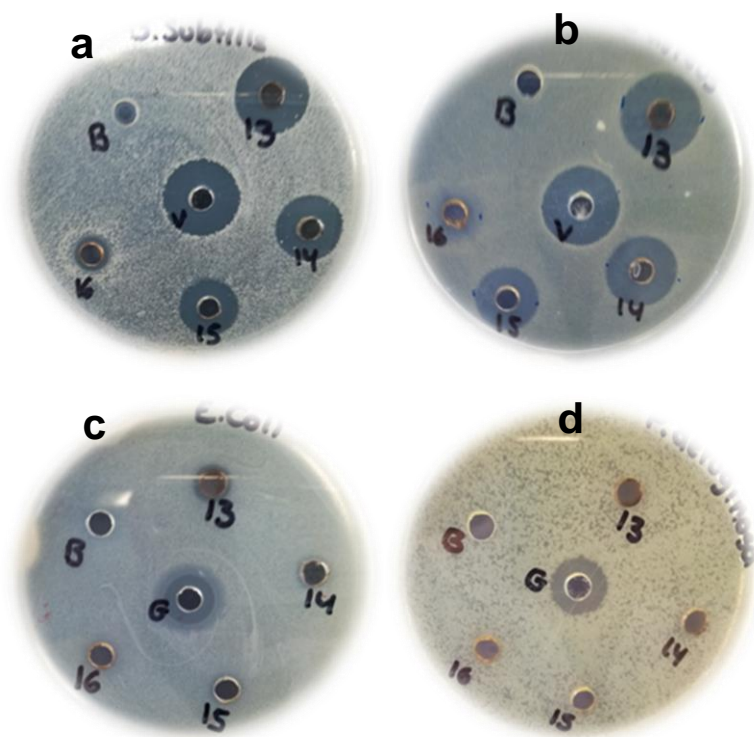


Figura 3-87. Halos de inhibición de la (+)-3-metoxinordomesticina, evaluada a: **13** 2 mg/mL; **14** 1 mg/mL y **15** 0,5 mg/mL frente a: **a.** *B. subtilis*, **b** *S. aureus*, **c.** *E. coli* y **d.** *P. aeruginosa*. **B:** DMSO y **V:** vancomicina.

4. Conclusiones y perspectivas.

En la presente tesis se estudiaron las partes aéreas de *Ocotea caudata* en búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, contribuyendo al conocimiento fitoquímico de la especie, el género *Ocotea* y las Lauráceas en Colombia, debido a que no existen reportes de estudios previos en *O. caudata*. Además, se realizaron modificaciones sintéticas adicionando a la boldina agentes alquilantes. Los metabolitos encontrados en este trabajo se reportan por primera vez para la especie.

Mediante el estudio fitoquímico se aislaron e identificaron veintiséis metabolitos secundarios, tres de ellos encontrados por primera vez en el género y la familia y otro (**Oc-21**) correspondiente a un esqueleto *noraporfínico* sin reportes previos en la literatura, estos resultados aportan información para la quimiotaxonomía del género y la familia Lauraceae, en cuanto a la producción de alcaloides isoquinolínicos y flavonoides en *Ocoteas*. El aislamiento de diversos metabolitos secundarios de *O. caudata* muestran una estrecha relación quimiotaxonómica de la planta con otras especies del género, permitiendo clasificar la *O. caudata* dentro de las especies de *Ocotea* que acumulan alcaloides y no lignanos, además confirma la presencia de flavonoides del tipo quercetina y kaempferol en el género.

Al extender los resultados del estudio fitoquímico a otras partes de la planta, mediante HPLC-DAD-MSESI, se determinó la presencia de varias sustancias aisladas de las hojas en la corteza, madera, frutos, cáliz y flores, encontrándose una relación muy estrecha entre la composición química de las hojas, flores, cáliz y frutos, mientras que en los extractos de corteza y madera la relación no es tan cercana, esto se debe posiblemente a que la corteza y madera no presentan los mismos compuestos pero si otros relacionados con los obtenidos que merecen ser objeto de estudio, por lo que se

recomienda realizar una exploración más detallada de los extractos de madera y corteza encaminada a la búsqueda de éstos metabolitos.

El perfil de los metabolitos secundarios incluyó la extracción del aceite esencial (AE) de hojas de *O. caudata*, que produjo un rendimiento del 0,37 % (m/m). La identificación del AE muestra que los sesquiterpenos son los compuestos más abundantes constituyendo el 83,7 % de la composición química, siendo el germacreno D el componente mayoritario con el 55,8 % del total del aceite esencial. Además de germacreno D, se hallaron nueve terpenos que también son comunes a otras especies de *Ocotea* provenientes de Sur América, lo cual indica la cercana relación quimiotaxonómica entre *O. caudata* y otras especies de *Ocotea* que contienen exclusivamente terpenos en su aceite esencial a diferencia de las que aparte de terpenos también producen fenilpropanoides o derivados bencenoides. La actividad antibacteriana del aceite esencial exhibió inhibición frente a dos bacterias Gram positivas (*B. subtilis* y *S. aureus*), esta acción se debe posiblemente al germacreno D, el cual ha presentado comprobada actividad antimicrobiana.

Sobre la composición del aceite esencial de *O. caudata* se encuentra alguna literatura relacionada con su composición, no obstante en dicha información se confunde esta especie con otra planta conocida tradicionalmente como palo de rosa (*Aniba roseadora*), en este trabajo se comprueba la diferencia entre los dos aceites dado que en la *O. caudata* no se encontró linalol que es el componente principal del aceite de *Aniba roseadora*, responsable de la nota odorífera de su aceite.

Los frutos y el cáliz de *O. caudata* presentan un alto contenido de ácidos grasos (54,9 % y 44,3 % respectivamente), que en su mayoría son saturados (72,6 % para los frutos y 83,1 % para el cáliz), siendo el ácido graso más abundante el ácido láurico (un poco más del 50 %), este contenido de ácidos grasos permite clasificar los frutos de Lauráceas, cotejando con otras especies de la familia, como productoras de ácido láurico (C₁₂) y ácido oleico (C_{18:2}) en sus frutos. Si se compara con el aceite de coco que contiene el 50 % de ácido láurico, el alto contenido de éste en los frutos de *O. caudata* (51,7 %) le proporciona un mayor valor comercial a la especie que permitió sugerir su

aprovechamiento en la elaboración de una emulsión. El producto elaborado en su estudio preliminar presentó características fisicoquímicas y sensoriales recomendadas para una emulsión con posibles usos vía tópica. La incorporación de ácidos grasos le brindó a la emulsión un color y aroma agradable y mayor emoliencia. No obstante, la explotación de este recurso requerirá programas de propagación de la especie y prácticas de cultivos sostenibles que permita la disponibilidad de material para la extracción de los ácidos grasos dado que una limitante es la producción de los frutos. También se recomienda elaborar mayor cantidad de la emulsión y seguir un modelo de calidad basado en el diseño (QbD) que permita valorar el producto desde los insumos hasta el producto final con el fin de obtener una funcionalidad específica para la emulsión.

La actividad antibacteriana de los metabolitos aislados (**Oc-1** – **Oc-26**) confirmó la efectiva acción de los compuestos tipo ácido graso, esteroides y fenoles como agentes antibacterianos. No obstante, para los alcaloides aislados este trabajo aporta a la escasa información relacionada con la acción de este tipo de compuestos aporfínicos frente a cuatro bacterias patógenas. En este sentido, y con miras a obtener antibióticos a partir de estos núcleos, es deseable que en su estructura contengan grupos bencenodioxol, no posean grupos fenólicos y sean *nor*aporfínicos, de acuerdo con esto son destacables los resultados de la actividad de la 3-metoxinordomesticina (**Oc-19**) y la nordomesticina (**Oc-19**) frente a *S. aureus*, que podrían sugerir su estudio en las Infecciones por estafilococos resistentes a la meticilina conocidas como SARM (MRSA en inglés). Así mismo, los resultados de la actividad de la thalictuberina (**Oc-16**) y la 3-O-demetilthalictuberina (**Oc-17**) contra *E. coli* contribuyen al conocimiento de los alcaloides fenantrénicos como antibacterianos, de lo cual se tiene poca información en la literatura. Este hecho condujo a proponer la modificación de un alcaloide aporfínico para obtener alcaloides fenantrénicos con el fin de observar cambios en la actividad antibacteriana.

La modificación de boldina (**Oc-23**), un alcaloide aporfínico, permitió la síntesis de cuatro alcaloides fenantrénicos del tipo secoboldina: *N*-propargilsecoboldina (**S-1**), *N*-cinamilsecoboldina (**S-2**), *N*-prenil-7-*O*-prenilsecoboldina (**S-3**) y *N*-prenilsecoboldina (**S-4**), vía degradación de Hofmann. Los cuatro alcaloides modificados obtenidos en esta

tesis no presentan reportes previos en la literatura. Desafortunadamente la poca cantidad disponible del compuesto de partida (**Oc-23**) no permitió realizar más ensayos para la síntesis de un mayor número de alcaloides fenantrénicos con el fin de establecer para este tipo de sustancias relaciones entre la estructura y la actividad antibacteriana. No obstante, este trabajo contribuyó al estudio de la actividad antibacteriana de alcaloides de tipo fenantrénico que tiene escasos reportes en la literatura, encontrándose que se mejora la actividad cuando se agregan grupos voluminosos especialmente con anillos bencénicos, también se mejora la acción cuando se alquilan los grupos fenólicos del núcleo fenantrénico.

Bibliografía

1. Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003;64(1):3-19.
2. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 2001;161(5):839-851.
3. Duarte, O., Velho, L. Capacidades científicas y tecnológicas de Colombia para adelantar prácticas de bioprospección. *Revista Iberoamericana de Ciencia Tecnología y Sociedad*. 2009;4(12):55-68.
4. Madriñan, S. Lauraceae (Avocado Family). En: Smith, N., Henderson, A., Stevenson, D. y Heald, S. (Eds). *Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton, PA: Princeton University Press; 2004. 204-206 pp.
5. Werff, Hvd., Richter, H. G. Toward an Improved Classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1996;83(3):409-418.
6. Chanderbali, A. S, Werff, Hvd., Renner, S. S. Phylogeny and Historical Biogeography of Lauraceae: Evidence from the Chloroplast and Nuclear Genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 2001;88(1):104-134.
7. Flórez, A., Arango, J. Reconocimiento e identificación de la flora etnomedicinal de las comunidades indígenas Senú de Necoclí (Urabá, noroccidente Colombiano). *Botánica Complutensis*. 2010;34:71-81.

8. Marques, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*. 2001;8(1):195-206.
9. Cordell, G. A., Colvard, M. D. Natural Products and Traditional Medicine: Turning on a Paradigm. *Journal of Natural Products*. 2012;75(3):514-525.
10. Zschocke, S., van Staden, J., Paulus, K., Bauer, R., Horn, M. M., Munro, O. Q., Brown, N. J., Drewes, S. E. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry*. 2000;54(6):591-5.
11. Coy, E. D., Cuca, L. E., Sefkow, M. COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009;19(24):6922-6925.
12. Pabón, L. C., Cuca, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). *Quimica Nova*. 2010;33(4):875-879.
13. Fournet, A., Ferreira, M. E., Rojas, A., Guy, I., Guinaudeau, H., Heinzen, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*. 2007;78(5):382-384.
14. Chang, S-T., Chen, P-F., Chang, S-C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;77(1):123-127.
15. Palazzo, M. C., Agius, B., Wright, B., Haber, W., Moriarity, D., Setzer, W. Chemical Compositions and Cytotoxic Activities of Leaf Essential Oils of Four Lauraceae Tree Species from Monteverde, Costa Rica. *Records of Natural Products*. 2009;3(1):32-37.
16. Guerrini, A., Sacchetti, G., Muzzoli, M., Moreno, G., Medici, A., Besco, E., Bruni, R. Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) Calyces by

GC-MS and NMR Fingerprinting and Its Antimicrobial and Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006;54(20):7778-88.

17. Werff, Hvd. A Synopsis of *Ocotea* (Lauraceae) in Central America and Southern Mexico. Annals of the Missouri Botanical Garden. 2002;89(3):429-51.
18. The Angiosperm Phylogeny Group. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. Annals of the Missouri Botanical Garden. 1998;85(4):531-53.
19. Discover life [sitio web]. 2016. U.S. [Consulta: 12 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.discoverlife.org/>.
20. Sanz-Biset, J., Campos-de-la-Cruz, J., Epiqui n-Rivera, M. A., Ca nigueral, S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). Journal of Ethnopharmacology. 2009;122(2):333-62.
21. García-Barriga, H. Flora medicinal de Colombia. Botánica Médica. Tomo I. 2a. ed. Tercer mundo editores. Bogotá, Colombia. 1992. 364-366 pp.
22. Ballabeni, V., Tognolini, M., Giorgio, C., Bertoni, S., Bruni, R., Barocelli, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *In vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties. Fitoterapia. 2010;81(4):289-95.
23. Klinger, W. Estado de conservación de las especies forestales amenazadas, abarco, jigua negro, guayaquil, guayacán amarillo y pino amarillo en los municipios chocoanos de Riosucio, Carmen del Darién, Istmina, Río Quito y Jurad . Bioetnia. 2009;6(1):4-17

-
24. Reynel, C., Pennington, R. T., Pennington, T. D., Marcelo, J., Daza, A. Árboles útiles del Ande Peruano: una guía de identificación, ecología y propagación de las especies de la sierra y los bosques montanos en el Perú. ICRAF DIP (Ed.). Lima, Perú. 2006. 80 p.
25. Moreno-Casasola, P., Paradowska, K. Especies útiles de la selva baja caducifolia en las dunas costeras del centro de Veracruz. *Madera y Bosques*. 2009;15(3):21-44
26. Weiss, E. A. Essential oil crops. International C (Ed.). New York. 1997. 63 p.
27. Graham, J. G., Pendland, S. L., Prause, J. L., Danzinger, L. H., Schunke-Vigo, J., Cabieses, F., Farnsworth, N. R. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. *Phytomedicine*. 2003;10:528–35.
28. Ballabeni, V., Tognolini, M., Bertoni, S., Bruni, R., Guerrini, A., Moreno, G., Barocelli, E. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. *Pharmacological Research*. 2007;55:23–30.
29. Tognolini, M, Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences*. 2006;78(13):1419-1432.
30. Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*. 2004;85(3):415-421.

31. Costa, P. Safrol e eugenol: Estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. *Química Nova*. 2000;23(3):357-369.
32. Gottlieb, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*. 1972;11(5):1537-70.
33. Andrei, C. C., Braz-filho, R., Gottlieb, O. R. Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. *Phytochemistry*. 1988;27(12):3992-3993.
34. Garcez, W. S., Garcez, F. R., Da Silva, L. M., Shimabukuro, A. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2005;16(6B):1382-1386.
35. Moraes, L. C., Almeida, R. N., da-Cunha, E. V., da-Silva, M. S., Barbosa-Filho, J. M., Gray, A. I. Further lignans from *Ocotea duckei*. *Pharmaceutical Biology*. 1999;37(2):144-147.
36. Monte, R. L., Sousa, L. M., Dias, C. S., Barbosa-Filho, J. M., Oliveira, M. R., Figueiredo, R. C. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Experimental Parasitology*. 2011;127:215–221.
37. Marques, M. O. M., Gomes, M. C., Yoshida, M., Gottlieb, O. R. Bicyclo [3.2.1] octanoid neolignans from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry*. 1991;31(1):275-277.
38. Stevenson, R. Some Aspects of the Chemistry of Lignans. En: Atta, R.(Ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*: Elsevier. 1995. 311-356 pp.

-
39. Cuca, L. E., Leon, P., Coy, E. D. A bicyclo[3.2.1]octanoid neolignan and toxicity of the ethanol extract from the fruit of *Ocotea heterochroma*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009;45(2):179-181.
40. De Oliveira, R. R., Heringer, A. P., Figueiredo, MR, Futuro, D.O., Coelho-Kaplan, M. A. Isolation of neolignans from *Ocotea elegans* by CCC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2006;29(2):229-34.
41. Coy, E. D., Cuca, L. E., Sefkow, M. PAF-antagonistic bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from leaves of *Ocotea macrophylla* Kunth. (Lauraceae). *Phytochemistry*. 2009;70:1309–1314.
42. Cabral, M. M., Barbosa-Filho, J. M., Maia, G. L. A., Chaves, M. C., Braga, M. V., de Souza, W. y Soares, R. O. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*. 2010;124:319–324.
43. Lordello, A. L., Yoshida, M. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry*. 1997;46(4):741-744.
44. Funasaki, M., Lordello, A. L. L., Viana, A. M., Santa-Catarina, C., Floh, E. I., Yoshida, M. Neolignans and sesquiterpenes from leaves and embryogenic cultures of *Ocotea Catharinensis* (Lauraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009;20:853-859.
45. Drewes, S. E., Horn, M. M., Sehlapelo, B. M., Ramesar, N., Field, J. S., Shaw, S. *Iso*-ocobullenone and a neolignan ketone from *Ocotea bullata* bark. *Phytochemistry*. 1995;38(6):1505-1508.

46. David, J. M., Yoshida, M., Gottlieb, O. R. Neolignans from bark and leaves of *Ocotea porosa*. *Phytochemistry*. 1994;36(2):491-499.

47. Castro, O. C. Chemical and Biological Extractives of Lauraceae Species in Costa Rican Tropical Forests. En: Downum, K. R., Romeo, J. T. y Stafford, H. A. (Eds). *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Springer US. 1993;27. 78 p.

48. Kametani, T., Honda, T. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. En: Brossi, A. (Ed.). *Aporphine Alkaloids*. Academic Press. 1985;24. 232 pp.

49. Oscar, C. C., Janzen, D. H., Dodson, C. D., Stermitz, F. R. Neolignans from fruits of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry*. 1987;26(7):2037-2040.

50. Pérez, E. G., Sáez, J., Cassels, B. K. A convenient, renewable source of the anxiolytic proaporphine alkaloid glaziovine: *Duguetia vallicola* leaves. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2005;50(3):45-53.

51. Zanin, S. M. W., Lordello, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*. 2007;30:92-98.

52. Garcez, W. S., Yoshida, M. y Gottlieb O. R. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*. 1995;39(4):815-816.

53. Morais, L. C., Barbosa-Filho, J. M., Almeida, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;62(1):57-61.

-
54. Coy, E. D., Cuca, L. E. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2009;37(4):522-524.
55. Garcez, F. R., Da Silva, A. F., Garcez, W. S., Linck, G., Matos, F. M. C., Santos, E. C. S. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Medica*. 2011;77(4):383-387.
56. Batista, A. N., Batista Jr, J. M., López, S. N., Furlan, M., Cavaleiro, A. J., Silva, D. H., Bolzani, V., Nunomura, S., Yoshida, M., López, S. N., Furlan, M., Cavaleiro, A. J., Silva, D. H. S. Aromatic compounds from three brazilian Lauraceae species. *Química Nova*. 2010;33(2):321-323.
57. Takaku, S., Haber, W. A., Setzer, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007;35(8):525-532.
58. Chaverri, C., Díaz, C., Cicció, J. F. Chemical analysis of essential oils from *ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) collected at "Reserva Biológica Alberto M. Brenes" in Costa Rica and their cytotoxic activity on tumor cell lines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011;22(4):741-745.
59. Pereira, J. P., Gottlieb, O. R., Yoshida, M. 10-desmethyl-1-methyl-eudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry*. 1995;39(4):849-852.
60. Yi-Zhun, Z. Natural products Essential Resources for Human Survival. En: Yi-Zhun, Z., Benny, K. H., Boon-huat, B. (Eds). World Scientific Publishing Ed. Ltd. 2007. 45-47 pp.

61. Verpoorte, R., Alfermann, A. W. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Editor. Publishers Dordrecht, London. 2000. 217 p.
62. Ortholand, J-Y, Ganesan, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. Current Opinion in Chemical Biology. 2004;8(3):271-80.
63. Remington, J. P. Relación estructura-actividad y diseño de drogas. En: Gennaro, A. R. (Ed.). Remington farmacia. Tomo I. Médica Panamericana Editors. 20 ed. 2000. 527-530 pp.
64. Newman, D. J., Gordon, M. C. Natural Product Chemistry for Drug Discovery. En: Buss, A. D., Butler, M. S. (Eds). Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. RSC Biomolecular Sciences. Royal Society of Chemistry Editors. 2010. 12 p.
65. Ward, R. S. Recent advances in the chemistry of lignans. En: Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur, R. (Ed.). Elsevier Science B.V. 2000;24. 781-791 pp.
66. Venkateswarlu, R., Kamakshi, C., Moinuddin, S. G. A, Subhash, P. V., Ward, R. S., Pelter, A. Transformations of lignans. Part IV: Oxidative and reductive rearrangements of dibenzocyclooctadiene and spirodienone lignans. Tetrahedron. 2001;57(26):5625-5632.
67. Rensheng, X., Yang, Y., Weimin, Z. Introduction to Natural Products Chemistry. CRC Press Editors. US. 2010. 243-244 pp.
68. López-Lázaro, M., Gálvez, M., Martín-Cordero, M., Ayuso, M. J. Citotoxicity of flavonoids on cancer lines. Structure-activity relationship. Studies in Natural Products Chemistry. 2002;27:891-932.

69. Bilbao, M. R. Analisis Fitoquimico Preliminar. Quimica de Productos Naturales. Editorial Universidad del Quindio. 1997. Armenia, Colombia. 1997. 183 pp.
70. Prieto, J. Estudio fitoquímico de *Compsonura capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus sp.* Tesis de Doctorado en Ciencias-Química. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2012, 121-126 pp.
71. ACD/MS Manager: Software for processing, interpreting, and storing MS data. [sitio web]. 2016. [Consulta: 1 agosto 2016]. http://www.acdlabs.com/products/adh/ms/ms_man/.
72. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M.: MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. BMC Bioinformatics. 2010;11:395.
73. The Unscrambler Methods. CAMO Software AS. [sitio web]. 2016. [Consulta: 1 agosto 2016]. <http://www.camo.com/downloads/U9.6%20pdf%20manual/The%20Unscrambler%20Methods.pdf>
74. Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. 4th Ed. Allured, Carol Stream, IL, US. 2007. 804 p.
75. Gil, E., Cuca, L. E., Delgado, W. A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Ocotea caudata* (Nees) Mez (Lauraceae) from

Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2016;15(4):258–263.

76. Thurnofer, S., Vetter, W. A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after the formation of fatty acid methyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:8896-8903
77. A.O.A.C. Official Methods of Analysis 17th Edition, Association of Official Agric. Chem. Washington D.C. 2000.
78. Passi, S., De Pità, O., Puddu, P., Littarru, G. P. Lipophilic Antioxidants in Human Sebum and Aging. *Free Radical Research*. 2002:471–477.
79. Pons, A., Timmerman, P., Leroy, Y., Zanetta, J. P. Gas-chromatography/mass-spectrometry analysis of human skin constituents as heptafluorobutyrate derivatives with special reference to long-chain bases. *Journal of Lipid Research*. 2002;794–804.
80. Kumar, S., Nagpal, K., Saini, S. Semisolid Dosage Forms. En: *Pharmaceutics: Basic Principles and Application to Pharmacy Practice*. 1st Ed.: Dash, A., Singh, S. y Tolman, J. (Eds.). 2013. 246 pp.
81. Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012;75(3):311-335.
82. Zhong, M., Liu, Y., Liu, J., Di, D., Xu, M., Yang, Y., Li, W., Chen, Y., Liu, J. /Isocorydine Derivatives and Their Anticancer Activities. *Molecules*. 2014;19:12099-12115.

-
83. Udvardy, A., Miskovics, A., Sipos, A. Antibacterial aporphinoids – progress and perspectives based on structure-activity analysis. *International Bulletin of Drug Research*. 2014;4(6):1-34.
84. Custódio, D., da Veiga, V. F. Lauraceae alkaloids. *RSC Advances*. 2014;4:21864–21890.
85. García, M. T., Blázquez, M. A., Ferrándiz, M. J., Sanz, M. J., Silva-Martín, N., Hermoso, J. A., de la Campa, A. G. New Alkaloid Antibiotics That Target the DNA Topoisomerase I of *Streptococcus pneumonia*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286:6402-6413.
86. Zhang, A., Zhang, Y., Branfman, A. R., Baldessarini, R. J., Neumeyer, J. L. Advances in Development of Dopaminergic Aporphinoids. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007;50(2):171-181.
87. Liu, Z., Zhang, H., Ye, N., Zhang, J., Wu, Q., Sun, P., Li, L., Zhen, X., Zhang, A. Synthesis of Dihydrofuroaporphine Derivatives: Identification of a Potent and Selective Serotonin 5-HT_{1A} Receptor Agonist. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;53:1319–1328.
88. Lee, S. S., Lin, Y. J., Chen, M. Z., Wu, Y. C., Chen, C. H. A facile semisynthesis of litebamine, a novel phenanthrene alkaloid, from boldine via a biogenetical approach. *Tetrahedron Letters*. 1992;33(42):6309-6310.
89. Sánchez, J. M. Las enfermedades infecciosas en la historia humana. Amertown International S.A. México. 1a. Ed. 2011. 162-164 pp.

90. Valgas, C., Souza, S., Smânia, E. F. A., Smânia Jr., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38:369-380.
91. CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty fifth informational supplement. M-100 S-25. 2015;35(3):1–16.
92. Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016;6:71–79.
93. Garcez, F., Garcez, W., Hamerski, L., Miranda, A. Eudesmane and rearranged eudesmane sesquiterpenes from *Nectandra cissiflora*. *Quimica Nova*. 2010;33:1739-1742.
94. Garrett, R., Romanos, M. T. V., Borges, R. M., Santos, M. G., Rocha, L., da Silva, A. J. R. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2012;22(2):306–313.
95. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3rd Edition. John Wiley and Sons, Ltd. 2009. 10-12 pp.
96. Oger, J. M., Duval, O., Richomme, P., Bruneton, J., Guinaudeau, H. *R*-(+)-Noranicanine a new type of trioxxygenated benzyloquinoline isolation and synthesis. *Heterocycles*. 1992;34(1):17-20.
97. Stévigny, C., Bailly, C., Quetin-Leclercq, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*. 2005;5:173.

-
98. Shamma, M. The simple tetrahydroisoquinolines. En: The Isoquinoline Alkaloids Chemistry and Pharmacology. Organic Chemistry A Series of Monographs. Blomquist, A. T. y Wasserman, H. (Eds). Academic Press Elsevier. New York and London. 1972. 1-40 pp.
99. Cavé, A., Leboeuf, M., Waterman, P. G. The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. En: Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Pelleiter, S. W. (Ed.). John Wiley & Sons, New York. 1987;5. 133 pp.
100. Guinaudeau, H., Leboeuf, M., Cavé, A. Aporphine Alkaloids II. Journal of Natural Products. 1979;42(4):325–360.
101. Guinaudeau, H., Leboeuf, M., Cavé, A. Aporphinoid Alkaloids III. Journal of Natural Products. 1983;46(6):761–835.
102. Guinaudeau, H., Leboeuf, M., Cavé, A. Aporphinoid Alkaloids IV. Journal of Natural Products. 1988;51(3):389–474.
103. Guinaudeau, H., Leboeuf, M., Cavé, A. Aporphinoids alkaloids V. Journal of Natural Products. 1994;57(8):1033-1135.
104. Cassels, B. K., Cavé, A., Leboeuf, M. The carbon-13 NMR spectra of 1, 2, 10-trioxygenated aporphines. Journal of Natural Products. 1987;50(2):297-300.
105. Marsaioli, A. J., Reis, F. A. M., Magalhães, A. F., Ruveda, E., Kuck, A. M. ¹³C NMR analysis of aporphine alkaloids. Phytochemistry. 1979;18(1):165-169.
106. Ringdahl, B., Chan, R. P. K., Craig, J. C., Cava, M. P., Shamma, M. Circular dichroism of aporphines. Journal of Natural Products. 1981;44:80–85.
107. Grundon, M. F., Shamma, M., Guinaudeau, H. Aporphinoid alkaloids. En: The Alkaloids. Grundon, M. F. (Eds.). 1982;12. 135-150 pp.

108. Stévigny, C., Jiwan, J. L., Rozenberg, R., de Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry*. 2004;18(5):523-528.
109. Achenbach, H., Renner, C., Wörth, J., Addae-Mensah, I. 3-Hydroxynornuciferin und 3-Hydroxyda,7-dehydronuciferin, Nebenalkaloide in *Hexalobus crispiflorus* - Massenspektrometrische Strukturfestlegung an Noraporphinen. *Liebigs Annalen der Chemie*. 1982;6:1132-1141.
110. Costa, V., Tavares, J., Queiroga, C., Castello-Branco, M., Melo, M., Uchôa, C., Santos, B., Pita, J., da Silva, M. Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. *Quimica Nova*. 2012;35(1):138-142.
111. Johns, S. R., Lamberton, J. A., Sioumis, A. A. Cassytha alkaloids. II. Alkaloids of *Cassytha pubescens* R. Br. *Australian Journal of Chemistry*. 1966;19(12):2331-2338.
112. Tewari, S., Bhakuni, D. S., Dhar, M. M. The aporphine alkaloids of *Litsea glutenosa*. *Phytochemistry*. 1972;11(3):1149-1152.
113. Castro, O., Hasbún, C. A novel alkaloid phenanthrene from *Ocotea insularis*. *Fitoterapia* 1993;64(5):440-441.
114. Saidi, N., Morita, H., Litaudon, M., Mukhtar, M. R., Awang, K., Hadi, A. H. A. Benzyloquinoline alkaloids from bark of *Cryptocarya rugulosa*. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2011;11(1):59-66.
115. Nimgirawath, S., Udomputtimekakul, P., Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Shen, Y. First Total Syntheses of (±)-Isopiline, (±)-Preocoteine, (±)-Oureguattidine and (±)-3-Methoxynordomesticine and the Biological Activities of (±)-3-Methoxynordomesticine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2009;57(4):368-376.

-
116. Jackman, L. M., Trewella, J. C., Moniot, J. L., Shamma, M., Stephens, R. L., Wenkert, E., Leboeuf, M., Cavé, A. The Carbon-13 NMR Spectra of Aporphine Alkaloids. *Journal of Natural Products*. 1979;42(5):437–449.
117. Bah, M., Gutiérrez-Avella, D., Fuentes-Ordaz, R., Castañeda-Moreno, R., Martínez, M. Chemical Constituents of the Mexican Mistletoe (*Psittacanthus calyculatus*). *Molecules*. 2011;16:9397-9403.
118. Matthes, H. W. D., Luu, B., Ourisson, G. Cytotoxic components of *Zingiber zerumbet*, *Curcuma zedoaria* and *C. domestica*. *Phytochemistry*. 1980;19:2643 – 2650.
119. Soliman, F. M., Shehata, A. H., Khaleel, A. E., Ezzat, S. M. An Acylated Kaempferol Glycoside from Flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. Dulce*. *Molecules*. 2002;7:245 – 251.
120. Kalebhari, M., Miguel, M. D., Gaspari-Dias, J., Lacava-Lordello, A. L., de Lima, C. P., Sasaki M. C. M., Zanin, S. M., dos Santos, M. C., Miguel, O. G. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;47(3):635-642.
121. Vieira, M. N., Winterhalter, P., Jerz, G. Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2016;27:116–125.
122. Zhang, H. L., Nagatsu, A., Okuyama, H., Mizukami, H., Sakakibara, J. Sesquiterpene glycosides from cotton oil cake. *Phytochemistry*. 1998;48(4):665-668.
123. Koteswara, Y., Vijaya-Bhaskar-Reddy, M., Venkata-Rao, C., Gunasekar, D., Blond, A., Caux, C., Bodo, B. Two New 5-Deoxyflavones from *Albizia odoratissima*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2002;50(9):1271—1272.

124. Wen, A., Xiu-Ping, L., Zhengchao, T., Xin-Peng, T., Xin, L., Mangaladoss, F., Zhonga, Z., Liu, Y. Axinelline A, a new COX-2 inhibitor from *Streptomyces axinellae* SCSIO02208. Natural Product Research. 2014;28(16):1219–1224.
125. Agerbirk, N., Warwick, S., Hansen, P. y Olsen, C. Sinapis phylogeny and evolution of glucosinolates and specific nitrile degrading enzymes. Phytochemistry. 2008;69:2937–2949
126. Bozzini, T., Botta, G., Delfino, M., Onofri, S., Saladino, R., Amatore, D., Sgarbanti, R., Nencioni, L., Palamara, A. T. Tyrosinase and Layer-by-Layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 2013;21(24):7699 – 7708.
127. Upadhyay, R. K., Rohatgi, L., Chaubey, M. K., Jain, S. C. Ovipositional Responses of the *Pulse Beetle*, *Bruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) to Extracts and Compounds of *Capparis decidua*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006;54:9747–9751.
128. Ortega, A., Toscano, R. A., Maldonado, E. A costic acid guaianyl ester and other constituents of *Podachaenium eminens*. Phytochemistry, 1998;49(4):1085 - 1090.
129. Prakash-Chaturvedula, V. S., Prakash, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. International Current Pharmaceutical Journal. 2012;1(9):239-242.
130. Noge, K., Becerra, J. X. Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus *Bursera* (Burseraceae). Molecules. 2009;14:5289-5297.
131. Setzer, W. N. Germacrene D Cyclization: An *Ab Initio* Investigation. International Journal of Molecular Sciences. 2008;9:89 – 97.

-
132. De Lima, S. G., Cito, A. M., Lopes, J. A. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* baill – Euphorbiaceae. *Revista Latinoamericana de Química*. 2010;38:133 - 144.
133. Lorenzo, D., Loayza, I., Leigue, L., Frizzo, C., Dellacassa, E., Moyna, P. Asaricin, the main component of *Ocotea opifera* Mart. essential oil. *Natural Product Letters*. 2001;15:163 – 170.
134. Hopkins, C. Y., Chisholm, M. J., Prince, L. Fatty Acids of *Lindera umbellata* and Other Lauraceae Seed Oils. *Lipids*. 1966;1(2):118–122.
135. Shorland, F. B. The Distribution of Fatty Acids in Plant Lipids. En: *Chemical plant Taxonomy*. Swain, T. (Ed.). 1963. 294-296 pp.
136. Wang, J. P., Meng, S. J., Li, J. M. Studies on the Distribution of Fatty Acids in the Oils of the Family Lauraceae. *Acta Botanica Sinica*. 1985;27(2):177-185.
137. Kotoky, R., Pathak, M. G., Kanjilal, P. B. Physico-chemical characteristics of seed oils of some *Litsea* species found in North-East India. *Natural Product Radiance*. 2007;6(4):297-300.
138. Wilkinson, J. B., Moore, R. J. *Cosmetología de Harry*. Traducido: Rodríguez M A, Rodríguez D. Editorial Díaz de Santos S.A. 1990. 73 p.
139. Shamma, M. The phenanthrene alkaloids. *Organic Chemistry A Series of Monographs*. En: *The Isoquinoline Alkaloids Chemistry and Pharmacology*. Academic Press. Elsevier. 2012;25. 259 – 264pp.
140. Shamma, M., Moniot, J. L. The phenanthrenes. En: *Isoquinoline Alkaloids Research*. 1972-1977. Plenum Press New York and London. 1978. 179 – 183 pp.

141. Castedo, L., Tojo, G. Phenanthrene Alkaloids. En: The alkaloids: Chemistry and Pharmacology. Brossi, A. (Ed.). Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. 1990;39. 99-135 pp.
142. Del Vechio, G., Sousa, O. V., Yamamoto, C. H., Kaplan, M. A. C. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). Records of Natural Products. 2009;3:52 – 57.
143. Kasim, L. S., Olaleye, K. O., Fagbohun, A. B., Ibitoye, S. F., Adejumo, O. E. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Struchium sparganophora* Linn. Ktze. Asteraceae. Advances in Biological Chemistry. 2014;4:246 – 252.
144. Pirbaloutia, G., Firoznehada, M., Crakerb, L., Akbarzadehc, L. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2013;23:861 – 869.
145. Silvério, M. S., Del-Vechio-Vieira, G., Pinto, M. A. O., Alves, M. S., Sousa, O. V. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae). Molecules. 2013;18:9785 – 9796.
146. Desbois, A. P., Smith, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010;85:1629–1642.
147. Sen, A., Dhavan, P., Shukla, K. K., Singh, S., Tejovathi, G. Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. Science Secure Journal of Biotechnology. 2012;1(1):9–13.
148. Mamoci, E., Cavoski, I., Simeone, V., Mondelli, D., Al-Bitar, L., Caboni, P. Chemical Composition and In Vitro Activity of Plant Extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against Postharvest Fungi. Molecules. 2011;16:2609 – 2625.

-
149. Nitiema, L. W., Savadogo, A., Simporé, J., Dianou, D., Traore, A. S. *In vitro* Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strains. *International Journal of Microbiological Research*. 2012;3(3):183 – 187.
150. Maddox, C. E., Laur, L. M., Tian, L. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*. 2010;60:53 – 58.
151. Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J. Review. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005;26:343–356.
152. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., Vijnov, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*. 2006;40(2):223 – 231.
153. Abbasoglu, U., Sener, B., Gunay, Y., Temize, H. Antimicrobial Activity of Some Isoquinoline Alkaloids. *Archiv der Pharmazie*. 1991;324:379 – 380.
154. Verpoorte, R. Antibacterially active alkaloids. En: *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. Roberts, M. F. y Wink, M. (Eds.). Plenum Press – New York. 1998. 411 – 413 pp.